

PATENT ABSTRACTS OF JAPAN

(11)Publication number : 2001-245666

(43)Date of publication of application : 11.09.2001

(51)Int.Cl.

C12N 15/09
A01H 5/00
A01K 67/027
A61K 39/395
A61K 45/00
A61P 25/00
A61P 35/00
C07K 14/705
C07K 16/28
C12N 1/15
C12N 1/19
C12N 1/21
C12N 5/10
C12P 21/02
C12Q 1/68
G01N 33/15
G01N 33/50
G01N 33/53
G01N 33/566
// C12P 21/08
(C12P 21/02
C12R 1:91)

(21)Application number : 2000-060548

(22)Date of filing : 06.03.2000

(71)Applicant : KYOWA HAKKO KOGYO CO LTD

(72)Inventor : SASAKI KATSUTOSHI
NAKAYA YUKIE
SAEKI SATOSHI
KAWAI HIROKI
NISHI TATSUYA
NAKAMURA YUSUKE
SUGANO SUMIO

(54) NEW POLYPEPTIDE

(57)Abstract:

PROBLEM TO BE SOLVED: To provide a method for obtaining a new G protein conjugated receptor polypeptide and searching a ligand, an agonist, an antagonist or a functional modulator of the polypeptide.
SOLUTION: This DNA encoding the new G protein conjugated receptor polypeptide can be obtained by randomly sequencing a cDNA clone selected from a cDNA library derived from a human stomach cancer cell. A searching system or a screening kit of a ligand, an agonist, an antagonist or a functional modulator of the polypeptide is obtained by using the polypeptide encoded by the DNA or its partial polypeptide. A compound obtained by using the searching system or the screening kit and an antibody to the polypeptide can be provided. A nonhuman mammal deficient in the DNA can be provided by using DNA.

LEGAL STATUS

[Date of request for examination]

[Date of sending the examiner's decision of rejection]

[Kind of final disposal of application other than the
examiner's decision of rejection or application
converted registration]

[Date of final disposal for application]

[Patent number]

[Date of registration]

[Number of appeal against examiner's decision of
rejection]

[Date of requesting appeal against examiner's
decision of rejection]

[Date of extinction of right]

Copyright (C); 1998,2003 Japan Patent Office

CORRECTION

[Date of Correction] 19.05.2003

[Inventor]

[PAJ ORIGINAL] NAKATANI YUKIE

[CORRECTED] NAKAYA YUKIE

* NOTICES *

JPO and NCIP are not responsible for any damages caused by the use of this translation.

1. This document has been translated by computer. So the translation may not reflect the original precisely.
2. **** shows the word which can not be translated.
3. In the drawings, any words are not translated.

CLAIMS

[Claim(s)]

[Claim 1] G protein conjugation mold acceptor polypeptide which has the amino acid sequence of a publication for the array number 1.

[Claim 2] The polypeptide which has the same activity as substantially [in the amino acid sequence of a polypeptide given in the array number 1, one or more amino acid is the polypeptides which have deletion and the amino acid sequence permuted or added, and] as a polypeptide according to claim 1.

[Claim 3] The partial peptide which is a partial peptide of G protein conjugation mold acceptor polypeptide according to claim 1 or 2, and has a binding affinity with the ligand of this polypeptide, agonist, an antagonist, or a functional modulator.

[Claim 4] DNA which carries out the code of the G protein conjugation mold acceptor polypeptide according to claim 1 or 2.

[Claim 5] DNA which has the base sequence expressed to the array number 2 by the base number of No. 175-1287 in DNA of a publication.

[Claim 6] DNA which is DNA chosen from DNA according to claim 4 or 5, and DNA hybridized under stringent conditions, and carries out the code of G protein conjugation mold acceptor polypeptide according to claim 1 and the polypeptide which has the same activity substantially.

[Claim 7] DNA which carries out the code of the partial peptide of G protein conjugation mold acceptor polypeptide according to claim 3.

[Claim 8] DNA which carries out the code of the partial peptide which is DNA which carries out the code of the partial peptide of the polypeptide by which a code is carried out to DNA according to claim 6, and has a binding affinity with the ligand of a polypeptide according to claim 1 or 2, agonist, an antagonist, or a functional modulator.

[Claim 9] The recombinant DNA which includes DNA of a publication in any 1 term of claims 4-8 at a vector, and is obtained.

[Claim 10] The transformed cell, transformation vegetation, or transformation non-Homo sapiens animal which holds a recombinant DNA according to claim 9.

[Claim 11] A transformed cell according to claim 10, transformation vegetation, or a transformation non-Homo sapiens animal is used. (i) This transformed cell is cultivated in a culture medium, and (ii) this transformation vegetation is grown in this culture. In this vegetation Or (iii) breed this transformation non-Homo sapiens animal, and generation are recording of a polypeptide according to claim 1 or 2 or the partial peptide according to claim 3 is carried out into this animal. The manufacture approach of the polypeptide according to claim 1 or 2 characterized by extracting this polypeptide or this partial peptide from this culture, this vegetation, or this animal, or a peptide according to claim 3.

[Claim 12] The antibody which recognizes a polypeptide according to claim 1 or 2 or a partial peptide according to claim 3.

[Claim 13] The immunological quantum approach of the polypeptide according to claim 1 or 2 using an antibody according to claim 12, or a partial peptide according to claim 3.

[Claim 14] The judgment approach of the dysfunction of the cancer using the quantum approach according to claim 13, a thalamus, or a cerebellum.

[Claim 15] The judgment approach of the dysfunction of the cancer by measuring the amount of mRNA(s) which carries out the code of Pori ** PUCHIDO according to claim 1 or 2, a thalamus, or a cerebellum.

[Claim 16] The judgment approach of the dysfunction of the cancer by detecting the deletion of the gene which carries out the code of Pori ** PUCHIDO according to claim 1 or 2, a permutation, or addition, a thalamus, or a cerebellum.

[Claim 17] The screening approach of the ligand of a polypeptide according to claim 1 or 2 which a polypeptide according to claim 1 or 2 or a partial peptide according to claim 3, and a subject sample are contacted, and is characterized by choosing the ligand, the agonist, antagonist, or functional modulator of a polypeptide according to claim 1 or 2 from a subject sample, agonist, an antagonist, or a functional modulator.

[Claim 18] The screening approach of the ligand of a polypeptide according to claim 1 or 2 which the cell which discovers a polypeptide according to claim 1 or 2 or a partial peptide according to claim 3, and a subject sample are contacted, and is characterized by choosing the ligand, the agonist, antagonist, or functional modulator of a polypeptide according to claim 1 or 2 from a subject sample, agonist, an antagonist, or a functional modulator.

[Claim 19] (i) A polypeptide according to claim 1 or 2 or a partial peptide according to claim 3, A polypeptide or a partial peptide according to claim 3 given in the case where ligand is contacted, and (ii) claims 1 or 2, The case where ligand and a subject sample are contacted is compared. From a subject sample The agonist of a polypeptide according to claim 1 or 2, The screening approach of the agonist of a polypeptide according to claim 1 or 2 characterized by choosing an antagonist or a functional modulator, an antagonist, or a functional modulator.

[Claim 20] (i) The cell which discovers a polypeptide according to claim 1 or 2 or a partial peptide according to claim 3, The cell which discovers the polypeptide or the partial peptide according to claim 3 of a publication to the case where ligand is contacted, and (ii) claims 1 or 2, The case where ligand and a subject sample are contacted is compared. From a subject sample The agonist of a polypeptide according to claim 1 or 2, The screening approach of the agonist of a polypeptide according to claim 1 or 2 characterized by choosing an antagonist or a functional modulator, an antagonist, or a functional modulator.

[Claim 21] The ligand of a polypeptide according to claim 1 or 2 characterized by containing a polypeptide according to claim 1 or 2 or a partial peptide according to claim 3, agonist, an antagonist, or the kit for screening of a functional modulator.

[Claim 22] The ligand of a polypeptide according to claim 1 or 2 obtained using the screening approach according to claim 17 to 20 or the kit for screening according to claim 21, agonist, an antagonist, a functional modulator, or its salt permitted in pharmacology.

[Claim 23] The remedy of the dysfunction of the cancer containing the matter chosen from an antibody according to claim 12, ligand according to claim 22, agonist, an antagonist, and a functional modulator, or its salt permitted in pharmacology, a thalamus, or a cerebellum.

[Claim 24] (i) The case where the cell which discovers a polypeptide according to claim 1 or 2, the cell which discovers the polypeptide of a publication to (ii) claims 1 or 2, and a subject sample are contacted is compared. The screening approach of a compound of fluctuating the amount of manifestations of DNA which carries out the code of the polypeptide according to claim 1 or 2 characterized by choosing from a subject sample the compound which fluctuates the gene expression which carries out the code of the polypeptide according to claim 1 or 2.

[Claim 25] The screening approach according to claim 24 characterized by measuring the amount of mRNA (s) which carries out the code of an approach according to claim 13 or the polypeptide according to claim 1 or 2 for fluctuation of the amount of manifestations by the approach of carrying out a quantum.

[Claim 26] The screening approach of a compound of fluctuating the amount of gene expression which the transformant and the subject sample containing DNA by which the reporter gene was connected with the lower stream of a river of the field which controls the imprint of the gene which carries out the code of the polypeptide according to claim 1 or 2 are contacted, and is characterized by to choose the compound which fluctuates the amount of manifestations of DNA which carries out the code of the polypeptide according to claim 1 or 2 from a subject sample and which carries out the code of the polypeptide according to claim 1 or 2.

[Claim 27] The screening approach according to claim 26 that the field which controls an imprint is a field specified by DNA which has the base sequence of 50-5000bp followed in DNA expressed with the 20202-25202nd base sequences of the array number 15.

[Claim 28] The compound obtained by the approach chosen as any 1 term of claims 24-27 from the screening approach of a publication, or its salt permitted in pharmacology.

[Claim 29] The remedy of the dysfunction of the cancer containing a compound or its salt permitted in pharmacology according to claim 28, a thalamus, or a cerebellum.

[Claim 30] DNA chosen from the oligonucleotide derivative of the oligonucleotide which has the same array as five to 60 base followed in the base sequence of DNA chosen from DNA according to claim 4 to 6 and DNA given in the array number 2, this oligonucleotide and the oligonucleotide which has a complementary array, and these oligonucleotides.

[Claim 31] How to control the imprint of DNA which carries out the code of the polypeptide according to claim 1 or 2, or the translation of mRNA using DNA which reaches claim 4-6 and is chosen as 30 from DNA of a publication.

[Claim 32] The deletion or the permutation non-Homo sapiens animal from which all or a part of genes containing DNA which carries out the code of the polypeptide according to claim 1 or 2 suffered a loss or permuted, and the amount of manifestations of a polypeptide according to claim 1 or 2 changed.

[Claim 33] The screening approach of the remedy of the dysfunction of the cancer which a subject sample contacts the organ of inoculation or this animal, an organization or a cell, and a subject sample to an animal according to claim 32, and is characterized by choosing the remedy of the dysfunction of cancer, a thalamus, or a cerebellum from a subject sample, a thalamus, or a cerebellum.

[Claim 34] The compound obtained by the screening approach according to claim 33, or its salt permitted in pharmacology.

[Claim 35] The remedy of the dysfunction of the cancer containing a compound or its salt permitted in pharmacology according to claim 34, a thalamus, or a cerebellum.

[Translation done.]

(19)日本国特許庁(JP)

(12)公開特許公報 (A)

(11)特許出願公開番号

特開 2001-245666

(P2001-245666A)

(43)公開日 平成13年9月11日(2001.9.11)

(51)Int. Cl. ⁷	識別記号	F I	テ-マ-ト*(参考)
C 1 2 N 15/09	Z N A	A 0 1 H 5/00	A 2B030
A 0 1 H 5/00		A 0 1 K 67/027	2G045
A 0 1 K 67/027		A 6 1 K 39/395	D 4B024
A 6 1 K 39/395			N 4B063
		45/00 1 0 1	4B064
審査請求 未請求 請求項の数35 O L		(全126頁) 最終頁に続く	

(21)出願番号 特願2000-60548(P2000-60548)

(22)出願日 平成12年3月6日(2000.3.6)

(71)出願人 000001029

協和醗酵工業株式会社
東京都千代田区大手町1丁目6番1号

(72)発明者 佐々木 克敏
東京都町田市旭町3丁目6番6号 協和醗酵
工業株式会社東京研究所内

(72)発明者 中谷 幸江
東京都千代田区大手町一丁目6番1号 協和
醗酵工業株式会社本社内

(72)発明者 佐伯 智
東京都町田市旭町3丁目6番6号 協和醗酵
工業株式会社東京研究所内

最終頁に続く

(54)【発明の名称】新規ポリペプチド

(57)【要約】

【課題】 新規なG蛋白質共役型受容体ポリペプチドを取得し、該ポリペプチドに対するリガンド、アゴニスト、アンタゴニストまたは機能修飾物質の探索方法を提供することを課題とする。

【解決手段】 本発明によれば、ヒト胃癌細胞由来のcDNAライブラリーから選ばれるcDNAクローンをランダムにシーケンスし、新規G蛋白質共役型受容体ポリペプチドをコードするDNAを取得できる。該DNAにコードされるポリペプチドまたはその部分ポリペプチドを用いて、該ポリペプチドのリガンド、アゴニスト、アンタゴニストまたは機能修飾物質の探索系またはスクリーニングキット、該探索系またはキットを用いて得られる化合物、該ポリペプチドに対する抗体を提供できる。また該DNAを用いて、該DNAが欠損した非ヒト哺乳動物を提供できる。

【特許請求の範囲】

【請求項1】 配列番号1に記載のアミノ酸配列を有するG蛋白質共役型受容体ポリペプチド。

【請求項2】 配列番号1に記載のポリペプチドのアミノ酸配列において、1個以上のアミノ酸が欠失、置換若しくは付加したアミノ酸配列を有するポリペプチドであり、かつ請求項1に記載のポリペプチドと実質的に同一の活性を有するポリペプチド。

【請求項3】 請求項1または2に記載のG蛋白質共役型受容体ポリペプチドの部分ペプチドであり、かつ該ポリペプチドのリガンド、アゴニスト、アンタゴニストまたは機能修飾物質との結合能を有する部分ペプチド。

【請求項4】 請求項1または2に記載のG蛋白質共役型受容体ポリペプチドをコードするDNA。

【請求項5】 配列番号2に記載のDNA中において、塩基番号175～1287番で表される塩基配列を有するDNA。

【請求項6】 請求項4または5に記載のDNAから選ばれるDNAとストリンジェントな条件下でハイブリダイズするDNAであり、かつ請求項1に記載のG蛋白質共役型受容体ポリペプチドと実質的に同一の活性を有するポリペプチドをコードするDNA。

【請求項7】 請求項3に記載のG蛋白質共役型受容体ポリペプチドの部分ペプチドをコードするDNA。

【請求項8】 請求項6に記載のDNAにコードされるポリペプチドの部分ペプチドをコードするDNAであり、かつ請求項1または2に記載のポリペプチドのリガンド、アゴニスト、アンタゴニストまたは機能修飾物質との結合能を有する部分ペプチドをコードするDNA。

【請求項9】 請求項4～8のいずれか1項に記載のDNAをベクターに組込んで得られる組換え体DNA。

【請求項10】 請求項9に記載の組換え体DNAを保有する形質転換細胞、形質転換植物または形質転換非ヒト動物。

【請求項11】 請求項10に記載の形質転換細胞、形質転換植物または形質転換非ヒト動物を用い、(i) 該形質転換細胞を培地中で培養し該培養物中に、(ii) 該形質転換植物を栽培し該植物中に、または(iii) 該形質転換非ヒト動物を飼育し該動物中に、請求項1または2に記載のポリペプチドまたは請求項3に記載の部分ペプチドを生成蓄積させ、該培養物、該植物または該動物から該ポリペプチドまたは該部分ペプチドを採取することを特徴とする、請求項1または2に記載のポリペプチドまたは請求項3に記載の部分ペプチドの製造方法。

【請求項12】 請求項1または2に記載のポリペプチド、または請求項3に記載の部分ペプチドを認識する抗体。

【請求項13】 請求項12に記載の抗体を用いる請求項1または2に記載のポリペプチド、または請求項3に記載の部分ペプチドの免疫学的定量方法。

【請求項14】 請求項13に記載の定量方法を用いる癌、あるいは視床または小脳の機能異常症の判定方法。

【請求項15】 請求項1または2に記載のポリペプチドをコードするmRNA量を測定することによる癌、あるいは視床または小脳の機能異常症の判定方法。

【請求項16】 請求項1または2に記載のポリペプチドをコードする遺伝子の欠失、置換または付加を検出することによる癌、あるいは視床または小脳の機能異常症の判定方法。

【請求項17】 請求項1または2に記載のポリペプチド、または請求項3に記載の部分ペプチドと、被験試料とを接触させ、被験試料より請求項1または2に記載のポリペプチドのリガンド、アゴニスト、アンタゴニストまたは機能修飾物質を選択することを特徴とする、請求項1または2に記載のポリペプチドのリガンド、アゴニスト、アンタゴニストまたは機能修飾物質のスクリーニング方法。

【請求項18】 請求項1または2に記載のポリペプチド、または請求項3に記載の部分ペプチドを発現する細胞と、被験試料とを接触させ、被験試料より請求項1または2に記載のポリペプチドのリガンド、アゴニスト、アンタゴニストまたは機能修飾物質を選択することを特徴とする、請求項1または2に記載のポリペプチドのリガンド、アゴニスト、アンタゴニストまたは機能修飾物質のスクリーニング方法。

【請求項19】 (i) 請求項1または2に記載のポリペプチド、または請求項3に記載の部分ペプチドと、リガンドとを接触させた場合と(ii) 請求項1または2に記載のポリペプチド、または請求項3に記載の部分ペプチドと、リガンドおよび被験試料とを接触させた場合とを比較し、被験試料より請求項1または2に記載のポリペプチドのアゴニスト、アンタゴニストまたは機能修飾物質を選択することを特徴とする、請求項1または2に記載のポリペプチドのアゴニスト、アンタゴニストまたは機能修飾物質のスクリーニング方法。

【請求項20】 (i) 請求項1または2に記載のポリペプチド、または請求項3に記載の部分ペプチドを発現する細胞と、リガンドとを接触させた場合と(ii) 請求項1または2に記載のポリペプチド、または請求項3に記載の部分ペプチドを発現する細胞と、リガンドおよび被験試料とを接触させた場合とを比較し、被験試料より請求項1または2に記載のポリペプチドのアゴニスト、アンタゴニストまたは機能修飾物質を選択することを特徴とする、請求項1または2に記載のポリペプチドのアゴニスト、アンタゴニストまたは機能修飾物質のスクリーニング方法。

【請求項21】 請求項1または2に記載のポリペプチド、または請求項3に記載の部分ペプチドを含有することを特徴とする、請求項1または2に記載のポリペプチドのリガンド、アゴニスト、アンタゴニストまたは機能

修飾物質のスクリーニング用キット。

【請求項22】 請求項17～20に記載のスクリーニング方法、または請求項21に記載のスクリーニング用キットを用いて得られる、請求項1または2に記載のポリペプチドのリガンド、アゴニスト、アンタゴニストまたは機能修飾物質、またはその薬理学的に許容される塩。

【請求項23】 請求項12に記載の抗体、請求項22に記載のリガンド、アゴニスト、アンタゴニストおよび機能修飾物質から選ばれる物質、またはその薬理学的に許容される塩を含有する、癌、あるいは視床または小脳の機能異常症の治療薬。

【請求項24】 (i) 請求項1または2に記載のポリペプチドを発現する細胞と、(ii) 請求項1または2に記載のポリペプチドを発現する細胞と被験試料とを接触させた場合とを比較し、被験試料より請求項1または2に記載のポリペプチドをコードする遺伝子の発現を変動させる化合物を選択することを特徴とする、請求項1または2に記載のポリペプチドをコードするDNAの発現量を変動させる化合物のスクリーニング方法。

【請求項25】 発現量の変動を、請求項13に記載の方法、または請求項1または2に記載のポリペプチドをコードするmRNA量を定量する方法で測定することを特徴とする、請求項24に記載のスクリーニング方法。

【請求項26】 請求項1または2に記載のポリペプチドをコードする遺伝子の転写を制御する領域の下流にレポーター遺伝子の連結されたDNAを含有する形質転換体と被験試料とを接触させ、被験試料より請求項1または2に記載のポリペプチドをコードするDNAの発現量を変動させる化合物を選択することを特徴とする、請求項1または2に記載のポリペプチドをコードする遺伝子の発現量を変動させる化合物のスクリーニング方法。

【請求項27】 転写を制御する領域が、配列番号15の20202～25202番目の塩基配列で表わされるDNA中の連続する50～5000bpの塩基配列を有するDNAで規定される領域である、請求項26に記載のスクリーニング方法。

【請求項28】 請求項24～27のいずれか1項に記載のスクリーニング方法から選ばれる方法によって得られる化合物またはその薬理学的に許容される塩。

【請求項29】 請求項28に記載の化合物またはその薬理学的に許容される塩を含有する、癌、あるいは視床または小脳の機能異常症の治療薬。

【請求項30】 請求項4～6に記載のDNAおよび配列番号2に記載のDNAから選ばれるDNAの塩基配列中の連続した5～60塩基と同じ配列を有するオリゴヌクレオチド、該オリゴヌクレオチドと相補的な配列を有するオリゴヌクレオチド、およびこれらオリゴヌクレオチドのオリゴヌクレオチド誘導体から選ばれるDNA。

【請求項31】 請求項4～6および30に記載のDN

Aから選ばれるDNAを用い、請求項1または2に記載のポリペプチドをコードするDNAの転写またはmRNAの翻訳を抑制する方法。

【請求項32】 請求項1または2に記載のポリペプチドをコードするDNAを含む遺伝子の全部または一部が欠損または置換し、請求項1または2に記載のポリペプチドの発現量が変化した遺伝子欠失または置換非ヒト動物。

【請求項33】 請求項32に記載の動物に被験試料を接種、または該動物の臓器、組織あるいは細胞と、被験試料とを接触させ、被験試料より、癌、あるいは視床または小脳の機能異常症の治療薬を選択することを特徴とする、癌、あるいは視床または小脳の機能異常症の治療薬のスクリーニング方法。

【請求項34】 請求項33に記載のスクリーニング方法で得られる化合物またはその薬理学的に許容される塩。

【請求項35】 請求項34に記載の化合物またはその薬理学的に許容される塩を含有する、癌、あるいは視床または小脳の機能異常症の治療薬。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【発明の属する技術分野】本発明は、ヒト視床由来の新規G蛋白質共役型受容体ポリペプチド、該ポリペプチドの部分ペプチド、該ポリペプチドまたは該部分ペプチドをコードするDNA、該DNAが組み込まれた組換え体ベクター、該組換え体ベクターを保有する形質転換体、該ポリペプチドまたは該部分ペプチドの製造方法、該ポリペプチドを認識する抗体、該ポリペプチドまたは該部分ペプチドを用いた該ポリペプチドのリガンド、アゴニスト、アンタゴニストまたは機能修飾物質のスクリーニング方法、該ポリペプチドまたは該部分ペプチドを含有する該ポリペプチドのリガンド、アゴニスト、アンタゴニストまたは機能修飾物質のスクリーニング用キット、該スクリーニング方法またはスクリーニング用キットによって得られる化合物またはその薬理学的に許容される塩、該ポリペプチドをコードする遺伝子を欠損または一部改変した動物とその利用方法に関する。

【0002】

【従来の技術】G蛋白質共役型受容体（以下、GPCRと略すこともある）は、生体の細胞や臓器の各機能細胞表面に存在し、生体の細胞や臓器の機能を調節する分子、例えばホルモン、神経伝達物質および生理活性物質等の受容体として機能することで、生理学的または病態学的に非常に重要な役割を担っている。GPCRは、光、味物質、匂い物質などの受容体としても機能している。GPCRの具体的なリガンドとしては、蛋白質、ペプチド、生体アミン、脂質メディエータ、光子、カルシウム、糖、核酸など多種多様のものが知られている。ヘテロ三量体（ G_{α} 、 G_{β} 、 G_{γ} ）のG蛋白質（guanine nucl

eotide-binding protein) と共役し、G蛋白質の活性化を通して細胞内にシグナルを伝達する。GPCRは7回の膜貫通領域を有することから、7回膜貫通型受容体とも呼ばれる。

【0003】GPCRは創薬ターゲットとして非常にすぐれており、これまでにGPCRの天然リガンド、アゴニストまたはアンタゴニストが薬となっている。現在上市されている薬の約60%はGPCRをターゲットにしたものである。GPCRは遺伝病の原因にもなっており、遺伝病の診断や治療においても重要なターゲットである〔Trends in Pharmacological Science, 18, 430 (1984)〕。

【0004】したがって、新規なGPCRを取得し、その機能解析を行うことは、その機能と密接に関連した医薬品開発を行う上で、非常に有用な手段を提供する。例えば、脳などの中枢神経系の器官においては、多くのホルモン、ホルモン様物質、神経伝達物質あるいは生理活性物質などによって、脳の生理的な機能が調節されているが、脳内には未知のホルモン、ホルモン様物質、神経伝達物質あるいは生理活性物質が存在すると考えられる。胃、腸、脾臓などの器官の生理機能も、多くのホルモン、ホルモン様物質、神経伝達物質あるいは生理活性物質などによって調節されていることが知られており、胃、腸、脾臓などの器官には未知のホルモン、ホルモン様物質、神経伝達物質あるいは生理活性物質が存在すると考えられる。脳、胃、腸、脾臓などの器官においては、上記のホルモン、ホルモン様物質、神経伝達物質あるいは生理活性物質に対応する受容体（例えばGPCR）が存在していることも知られているが、これらの器官には未知の受容体（例えばGPCR）も存在すると考えられる。既知GPCRについても、新たなサブタイプが存在する可能性もある。

【0005】脳、胃、腸、脾臓において発現している新規なGPCR遺伝子を取得できれば、該GPCRのアミノ酸配列と既知GPCRのアミノ酸配列とを比較したり、該GPCR遺伝子の転写物の発現分布を調べることにより、該GPCRの機能を推定し、医薬品開発に有用な情報を得ることができる。また、新規GPCR遺伝子が取得できれば、該GPCRに対する天然リガンド、アゴニスト、またはアンタゴニストを効率よくスクリーニングすることが可能になる。該天然リガンド、アゴニスト、またはアンタゴニストは医薬品として期待される。

【0006】

【発明が解決しようとする課題】これまで知られていないG蛋白質共役型受容体ポリペプチドおよび該ポリペプチドをコードするDNAが得られれば、該ポリペプチドのリガンド、アゴニスト、アンタゴニストまたは機能修飾物質のスクリーニングが可能になり、該スクリーニングによって得られる物質は医薬品として有用である。

【0007】本発明は、ヒト視床由来の新規G蛋白質共

役型受容体ポリペプチドまたはその部分ペプチド、該ポリペプチドまたは該部分ペプチドをコードするDNA、該DNAを含有する組換えベクター、該組換えベクターを保持する形質転換体、該ポリペプチドまたは該部分ペプチドの製造方法、該ポリペプチドに対するリガンド、アゴニスト、アンタゴニストまたは機能修飾物質のスクリーニング方法およびスクリーニング用キット、該スクリーニング方法および該スクリーニングキットを用いて得られるリガンド、アゴニスト、アンタゴニストまたは機能修飾物質と該リガンド、アゴニスト、アンタゴニストまたは機能修飾物質を含有する医薬、および該ポリペプチドまたはその部分ペプチドに対する抗体などを提供することを目的としている。

【0008】

【課題を解決するための手段】本発明者らは、鋭意研究を重ねた結果、ヒト胃癌細胞株 KATOIII由来のcDNAライブラリーの各cDNAクローンの配列をランダムにシーケンスすることにより、これまでに知られていなかった新規なGPCRの一部をコードするcDNAを単離することに成功した。該cDNAはC末端部分を欠失していたため、該新規GPCRポリペプチド全長をコードするcDNAをヒト視床より取得し、全塩基配列を決定・解析することにより、本発明を完成するに至った。

【0009】本発明は、以下の(1)～(35)に関する。

(1) 配列番号1に記載のアミノ酸配列を有するG蛋白質共役型受容体ポリペプチド。

(2) 配列番号1に記載のポリペプチドのアミノ酸配列において、1個以上のアミノ酸が欠失、置換若しくは付加したアミノ酸配列を有するポリペプチドであり、かつ(1)に記載のポリペプチドと実質的に同一の活性を有するポリペプチド。

(3) (1)または(2)に記載のG蛋白質共役型受容体ポリペプチドの部分ペプチドであり、かつ該ポリペプチドのリガンド、アゴニスト、アンタゴニストまたは機能修飾物質との結合能を有する部分ペプチド。

(4) (1)または(2)に記載のG蛋白質共役型受容体ポリペプチドをコードするDNA。

(5) 配列番号2に記載のDNA中において、塩基番号175～1287番で表される塩基配列を有するDNA。

(6) (4)または(5)に記載のDNAから選ばれたDNAとストリンジントな条件下でハイブリダイズするDNAであり、かつ(1)に記載のG蛋白質共役型受容体ポリペプチドと実質的に同一の活性を有するポリペプチドをコードするDNA。

(7) (3)に記載のG蛋白質共役型受容体ポリペプチドの部分ペプチドをコードするDNA。

(8) (6)に記載のDNAにコードされるポリペプチドの部分ペプチドをコードするDNAであり、かつ

(1) または (2) に記載のポリペプチドのリガンド、アゴニスト、アンタゴニストまたは機能修飾物質との結合能を有する部分ペプチドをコードするDNA。

(9) (4) ~ (8) のいずれか1つに記載のDNAをベクターに組込んで得られる組換え体DNA。

(10) (9) に記載の組換え体DNAを保有する形質転換細胞、形質転換植物または形質転換非ヒト動物。

(11) (10) に記載の形質転換細胞、形質転換植物または形質転換非ヒト動物を用い、(i) 該形質転換細胞を培地中で培養し該培養物中に、(ii) 該形質転換植物を栽培し該植物中に、または (iii) 該形質転換非ヒト動物を飼育し該動物中に、(1) または (2) に記載のポリペプチドまたは (3) に記載の部分ペプチドを生成蓄積させ、該培養物、該植物または該動物から該ポリペプチドまたは該部分ペプチドを採取することを特徴とする、(1) または (2) に記載のポリペプチドまたは (3) に記載のペプチドの製造方法。

(12) (1) または (2) に記載のポリペプチド、または (3) に記載の部分ペプチドを認識する抗体。

(13) (12) に記載の抗体を用いる (1) または (2) に記載のポリペプチド、または (3) に記載の部分ペプチドの免疫学的定量方法。

(14) (13) に記載の定量方法を用いる癌、あるいは視床または小脳の機能異常症の判定方法。

(15) (1) または (2) に記載のポリペプチドをコードするmRNA量を測定することによる癌、あるいは視床または小脳の機能異常症の判定方法。

(16) (1) または (2) に記載のポリペプチドをコードする遺伝子の欠失、置換または付加を検出することによる癌、あるいは視床または小脳の機能異常症の判定方法。

(17) (1) または (2) に記載のポリペプチド、または (3) に記載の部分ペプチドと、被験試料とを接触させ、被験試料より (1) または (2) に記載のポリペプチドのリガンド、アゴニスト、アンタゴニストまたは機能修飾物質を選択することを特徴とする、(1) または (2) に記載のポリペプチドのリガンド、アゴニスト、アンタゴニストまたは機能修飾物質のスクリーニング方法。

(18) (1) または (2) に記載のポリペプチド、または (3) に記載の部分ペプチドを発現する細胞と、被験試料とを接触させ、被験試料より (1) または (2) に記載のポリペプチドのリガンド、アゴニスト、アンタゴニストまたは機能修飾物質を選択することを特徴とする、(1) または (2) に記載のポリペプチドのリガンド、アゴニスト、アンタゴニストまたは機能修飾物質のスクリーニング方法。

(19) (i) (1) または (2) に記載のポリペプチド、または (3) に記載の部分ペプチドと、リガンドとを接触させた場合と (ii) (1) または (2) に記載

のポリペプチド、または (3) に記載の部分ペプチドと、リガンドおよび被験試料とを接触させた場合とを比較し、被験試料より (1) または (2) に記載のポリペプチドのアゴニスト、アンタゴニストまたは機能修飾物質を選択することを特徴とする、(1) または (2) に記載のポリペプチドのアゴニスト、アンタゴニストまたは機能修飾物質のスクリーニング方法。

(20) (i) (1) または (2) に記載のポリペプチド、または (3) に記載の部分ペプチドを発現する細胞と、リガンドとを接触させた場合と (ii) (1) または (2) に記載のポリペプチド、または (3) に記載の部分ペプチドを発現する細胞と、リガンドおよび被験試料とを接触させた場合とを比較し、被験試料より (1) または (2) に記載のポリペプチドのアゴニスト、アンタゴニストまたは機能修飾物質を選択することを特徴とする、(1) または (2) に記載のポリペプチドのアゴニスト、アンタゴニストまたは機能修飾物質のスクリーニング方法。

(21) (1) または (2) に記載のポリペプチド、または (3) に記載の部分ペプチドを含有することを特徴とする、(1) または (2) に記載のポリペプチドのリガンド、アゴニスト、アンタゴニストまたは機能修飾物質のスクリーニング用キット。

(22) (17) ~ (20) に記載のスクリーニング方法、または (21) に記載のスクリーニング用キットを用いて得られる、(1) または (2) に記載のポリペプチドのリガンド、アゴニスト、アンタゴニストまたは機能修飾物質、またはその薬理学的に許容される塩。

(23) (12) に記載の抗体、(22) に記載のリガンド、アゴニスト、アンタゴニストおよび機能修飾物質から選ばれる物質、またはその薬理学的に許容される塩を含有する、癌、あるいは視床または小脳の機能異常症の治療薬。

(24) (i) (1) または (2) に記載のポリペプチドを発現する細胞と、(ii) (1) または (2) に記載のポリペプチドを発現する細胞と被験試料とを接触させた場合とを比較し、被験試料より (1) または (2) に記載のポリペプチドをコードする遺伝子の発現を変動させる化合物を選択することを特徴とする、(1) または (2) に記載のポリペプチドをコードするDNAの発現量を変動させる化合物のスクリーニング方法。

(25) 発現量の変動を、(13) に記載の方法、または (1) または (2) に記載のポリペプチドをコードするmRNA量を定量する方法で測定することを特徴とする、(24) に記載のスクリーニング方法。

(26) (1) または (2) に記載のポリペプチドをコードする遺伝子の転写を制御する領域の下流にレポーター遺伝子の連結されたDNAを含有する形質転換体と被験試料とを接触させ、被験試料より (1) または (2) に記載のポリペプチドをコードするDNAの発現

量を変動させる化合物を選択することを特徴とする、

(1) または (2) に記載のポリペプチドをコードする遺伝子の発現量を変動させる化合物のスクリーニング方法。

(27) 転写を制御する領域が、配列番号15の20202~25202番目の塩基配列で表わされるDNA中の連続する50~5000bpの塩基配列を有するDNAで規定される領域である、(26)に記載のスクリーニング方法。

(28) (24)~(27)のいずれか1つに記載のスクリーニング方法によって得られる化合物またはその薬理学的に許容される塩。

(29) (28)に記載の化合物またはその薬理学的に許容される塩を含有する、癌、あるいは視床または小脳の機能異常症の治療薬。

(30) (4)~(6)に記載のDNAおよび配列番号2に記載のDNAから選ばれるDNAの塩基配列中の連続した5~60塩基と同じ配列を有するオリゴヌクレオチド、該オリゴヌクレオチドと相補的な配列を有するオリゴヌクレオチド、およびこれらオリゴヌクレオチドのオリゴヌクレオチド誘導体から選ばれるDNA。

(31) (4)~(6)および(30)に記載のDNAから選ばれるDNAを用い、(1)または(2)に記載のポリペプチドをコードするDNAの転写またはmRNAの翻訳を抑制する方法。

(32) (1)または(2)に記載のポリペプチドをコードするDNAを含む遺伝子の全部または一部が欠損または置換し、(1)または(2)に記載のポリペプチドの発現量が変化した遺伝子欠失または置換非ヒト動物。

(33) (32)に記載の動物に被験試料を接種、または該動物の臓器、組織あるいは細胞と、被験試料とを接触させ、被験試料より、癌、あるいは視床または小脳の機能異常症の治療薬を選択することを特徴とする、癌、あるいは視床または小脳の機能異常症の治療薬のスクリーニング方法。

(34) (33)に記載のスクリーニング方法で得られる化合物またはその薬理学的に許容される塩。

(35) (34)に記載の化合物またはその薬理学的に許容される塩を含有する、癌、あるいは視床または小脳の機能異常症の治療薬。

【0010】

【発明の実施の形態】(1)本発明のG蛋白質共役型受容体ポリペプチドまたはその部分ペプチド

本発明のポリペプチドは、G蛋白質共役型受容体ポリペプチドであり、例えば、配列番号1で表わされるアミノ酸配列を有するポリペプチドまたは該ポリペプチドのアミノ酸配列において1個以上のアミノ酸が欠失、置換若しくは付加されたアミノ酸配列を有するポリペプチドであり、かつ配列番号1で表されるアミノ酸配列を有する

ポリペプチドと実質的に同一な活性を有するポリペプチドをあげることができる。

【0011】本発明のポリペプチドの由来は特に限定されるものではなく、その由来として例えば、ヒトや哺乳動物(例えば、モルモット、ラット、マウス、ニワトリ、ウサギ、ブタ、ヒツジ、ウシ、サルなど)の細胞、あるいは該細胞の存在する組織をあげることができる。

【0012】該細胞の具体例としては、脾細胞、神経細胞、グリア細胞、脾臓β細胞、骨髓細胞、メサングウム細胞、ランゲルハンス細胞、表皮細胞、上皮細胞、内皮細胞、繊維芽細胞、繊維細胞、筋細胞、脂肪細胞、免疫細胞(例、マクロファージ、T細胞、B細胞、ナチュラルキラー細胞、肥満細胞、好中球、好塩基球、好酸球、単球)、巨核球、滑膜細胞、軟骨細胞、骨細胞、骨芽細胞、破骨細胞、乳腺細胞、肝細胞もしくは間質細胞、またはこれら細胞の前駆細胞、幹細胞もしくはガン細胞などをあげることができる。また該組織の具体例としては、脳、脳の各部位(例、嗅球、扁桃核、大脳基底核、海馬、視床、視床下部、視床下核、大脳皮質、延髄、小脳、後頭葉、前頭葉、側頭葉、被殻、尾状核、脳梁、黒質)、脊髄、下垂体、胃、脾臓、腎臓、肝臓、生殖腺、甲状腺、胆のう、骨髄、副腎、皮膚、筋肉、肺、消化管、血管、心臓、胸腺、脾臓、顎下腺、末梢血、末梢血球、腸管、前立腺、睾丸、精巣、卵巣、胎盤、子宮、骨、関節、小腸、大腸、骨格筋などをあげることができる。特に、脳や脳の各部位は組織として好ましい。

【0013】また本発明のポリペプチドは、化学合成によって合成されたポリペプチドであってもよい。

【0014】上記の1個以上のアミノ酸の欠失、置換若しくは付加されたアミノ酸配列からなり、かつ配列番号1で表されるアミノ酸配列を有するポリペプチドと実質的に同一な活性を有するポリペプチドは、Molecular cloning, A laboratory manual, Second Edition.(1989)

(以下、モレキュラー・クローニング第2版と略す)、Current Protocols in Molecular Biology, John and Wiley & Sons (1987-1997) (以下、カレント・プロトコールズ・イン・モレキュラー・バイオロジーと略す)、Nucleic Acids Research, 10, 6487 (1982)、Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 79, 6409 (1982)、Gene, 34, 315 (1985)、Nucleic Acids Research, 13, 4431 (1985)、Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 82, 488 (1985)等に記載の部位特異的変異導入法によりを用いて、例えば配列番号1で表されるアミノ酸配列を有するポリペプチドをコードするDNAに部位特異的変異を導入することにより取得することができる。欠失、置換若しくは付加されるアミノ酸の数は特に限定されないが、上記の部位特異的変異法等の周知の方法により欠失、置換若しくは付加できる程度の数であり、1~数十個程度、好ましくは1~20個程度、より好ましくは1~10個さらに好ましくは1~5個である。

【0015】また、該アミノ酸の欠失、置換若しくは付加されたアミノ酸配列を有するポリペプチドが配列番号1に記載のポリペプチドと実質的に同一な活性を有するには、BLAST [J. Mol. Biol., 215, 403 (1990)、Nucleic acids Research, 25, 3389 (1997)]、FASTA [Method in Enzymology, 183, 63 (1990)、Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 85, 2444 (1988)]等の解析ソフトを用いて計算したときに、配列番号1で表わされるアミノ酸配列と約70%以上、好ましくは約80%以上、さらに好ましくは約90%以上の相同性を有するアミノ酸配列を有することが好ましい。

【0016】上記の実質的に同一の活性としては、例えば、配列番号1に記載のアミノ酸配列で表されるペプチドの有するリガンド結合活性、シグナル情報伝達作用などが挙げられる。実質的に同一とは、それらの活性が性質的に同一であることを示す。したがって、リガンド結合活性やシグナル情報伝達作用の程度、蛋白質の分子量などの量的要素は異なってもよい。

【0017】本発明のポリペプチドとして、さらに上記ポリペプチドにおいて、N末端のメチオニン残基のアミノ基が保護基（例えば、ホルミル基、アセチル基などのC1-6アシル基など）で保護されているもの、N端側が生体内で切断され生成したグルタミル基がピログルタミン化したもの、分子内のアミノ酸の側鎖上の置換基（例えば、-OH、-COOH、アミノ基、イミダゾール基、インドール基、グアニジノ基など）が適当な保護基（例えば、ホルミル基、アセチル基などのC1-6アシル基など）で保護されているもの、あるいは糖鎖が結合したいわゆる糖蛋白質などの複合蛋白質なども含まれる。また、上記ポリペプチドのC末端がアミド（-CONH₂）またはエステル（-COOR）のもの本発明のポリペプチドである。ここでエステル基のRとしては、メチル、エチル、n-プロピル、イソプロピルもしくはn-ブチルなどのC1-6アルキル基、例えば、シクロペンチル、シクロヘキシルなどのC3-8シクロアルキル基、例えば、フェニル、 α -ナフチルなどのC6-12アリール基、例えば、ベンジル、フェネチルなどのフェニル-C1-2アルキル基もしくは α -ナフチルメチルなどの α -ナフチル-C1-2アルキル基などのC7-14アラルキル基のほか、経口用エステルとして汎用されるビバロイルオキシメチルエステルなどであってもよい。本発明のポリペプチドがC末端以外にカルボキシル基（またはカルボキシレート）を有している場合、カルボキシル基がアミド化またはエステル化されているものも本発明のポリペプチドに含まれる。この時のエステルとしては、例えば上記のC末端のエステルなどをあげることができる。

【0018】本発明のポリペプチドの塩としては、とりわけ生理学的に許容される酸付加塩が好ましい。このような塩としては、例えば無機酸（例えば、塩酸、リン酸、

臭化水素酸、硫酸）との塩、あるいは有機酸（例えば、酢酸、ギ酸、プロピオン酸、フマル酸、マレイン酸、コハク酸、酒石酸、クエン酸、リンゴ酸、蔞酸、安息香酸、メタンスルホン酸、ベンゼンスルホン酸）との塩などが用いられる。

【0019】本発明の部分ペプチドとは、本発明のポリペプチドの部分ペプチドであり、かつ本発明のポリペプチドのリガンド、アゴニスト、アンタゴニストまたは機能修飾物質との結合能を有するペプチドである。GPCRのリガンド結合領域は、細胞外領域、膜貫通領域、あるいは細胞外領域と膜貫通領域の両方であることが知られている [Current Opinion of Cell Biology, 6, 191 (1994)、EMBO J., 18, 1723 (1999)]。したがって、本発明のポリペプチドのリガンド、アゴニスト、アンタゴニストまたは機能修飾物質との結合能を有する本発明の部分ペプチドとしては、例えば、該ポリペプチドを発現している細胞において、該細胞の膜の外に露出している部分（細胞外領域部分）、あるいは膜結合領域部分を含む部分ペプチドなどをあげることができる。また、本発明の部分ペプチドは、個々のドメインを個別に含むペプチドでも良いし、複数のドメインを同時に含む部分ペプチドでも良い。

【0020】任意のGPCRの膜結合領域は、既知のGPCRとのホモロジーを基に予測することができる [EMBO J., 12, 1693 (1993)]。したがって、該方法で予測した膜結合領域を基に、任意のGPCRの細胞外領域と細胞内領域を予測することができる。また、ハイドロパシー解析（アロカ社より購入した解析ソフトMacMolIy3.5を使用）や膜結合領域予測解析（三井情報開発より購入した解析ソフトSOSUI system ver1.0/10を使用）を行うことによっても、任意のGPCRの膜結合領域、細胞外領域、および細胞内領域を予測することができる。

【0021】したがって、本発明のポリペプチドに関して上記解析を行うことにより、具体的な細胞外領域（親水性部位）、膜結合領域（疎水性領域）、および細胞内領域（親水性領域）を予測することができる。

【0022】具体的には、例えば、配列番号1で表されるアミノ酸配列を有する本発明のポリペプチドにおいては、細胞外領域としては、配列番号1で表わされるアミノ酸配列の第1番目～第49番目、第107番目～第121番目、第187番目～第208番目または第298番目～第309番目のアミノ酸配列で表される領域をあげることができ、また、膜結合領域としては、配列番号1で表わされるアミノ酸配列の第50番目～第75番目、第81番目～第106番目、第122番目～第147番目、第161番目～第186番目、第209番目～第234番目、第272番目～第297番目または第310番目～第335番目のアミノ酸配列で表される領域をあげることができる。

【0023】本発明の部分ペプチドとして、さらに上記

の部分ペプチドにおいて、N末端のメチオニン残基のアミノ基が保護基（例えば、ホルミル基、アセチル基などのC1-6アシル基など）で保護されているもの、N端側が生体内で切断され生成したグルタミル基がピログルタミン化したもの、分子内のアミノ酸の側鎖上の置換基（例えば、-OH、-COOH、アミノ基、イミダゾール基、インドール基、グアニジノ基など）が適当な保護基（例えば、ホルミル基、アセチル基などのC1-6アシル基など）で保護されているもの、あるいは糖鎖が結合したいわゆる糖ペプチドなどの複合ペプチドなども含まれる。また、上記部分ペプチドのC末端に存在するカルボキシル基（-COOH）またはカルボキシレート（-COO⁻）が、上記した本発明のポリペプチドと同様、アミドまたはエステル化されていてもよい。また、本発明の部分ペプチドがC末端以外にカルボキシル基（またはカルボキシレート）を有している場合、カルボキシル基がアミド化またはエステル化されているものも本発明の部分ペプチドに含まれる。この時のエステルとしては、例えば上記のC末端のエステルなどがあげられる。本発明の部分ペプチドの塩としては、とりわけ生理学的に許容される酸付加塩が好ましい。このような塩としては、例えば無機酸（例えば、塩酸、リン酸、臭化水素酸、硫酸）との塩、あるいは有機酸（例えば、酢酸、ギ酸、プロピオン酸、フマル酸、マレイン酸、コハク酸、酒石酸、クエン酸、リンゴ酸、蔞酸、安息香酸、メタンスルホン酸、ベンゼンスルホン酸）との塩などがあげられる。

（2）本発明のG蛋白質共役型受容体ポリペプチドまたはその部分ペプチドをコードするDNA

本発明のポリペプチドをコードするDNAは、本発明のポリペプチドをコードするDNAであればいかなるDNAでもよく、具体例として、（a）配列番号2に記載の塩基配列において塩基番号175～1287番で表される塩基配列を有するDNA、（b）（a）に記載のDNAとストリンジントな条件でハイブリダイズし、かつ配列番号1に記載のアミノ酸配列を有するポリペプチドと実質的に同一の活性を有するポリペプチドをコードするDNAなどをあげることができる。

【0024】上記のストリンジントな条件下でハイブリダイズし、かつ配列番号1に記載のアミノ酸配列を有するポリペプチドと実質的に同一の活性を有するポリペプチドをコードするDNAとは、上記（a）に記載のDNAをプローブとして、コロニー・ハイブリダイゼーション法、ブランク・ハイブリダイゼーション法あるいはサザンブロットハイブリダイゼーション法等を用いることにより得られるDNAを意味し、具体的には、コロニーあるいはブランク由来のDNAを固定化したフィルターを用いて、0.7～1.0 mol/LのNaCl存在下、42～65℃でハイブリダイゼーションを行った後、0.1～2倍濃度のSSC (saline-sodium citrat

e) 溶液（1倍濃度のSSC溶液の組成は、150 mmol/L 塩化ナトリウム、15 mmol/L クエン酸ナトリウムよりなる）を用い、42～65℃条件下でフィルターを洗浄することにより同定できるDNAをあげることができる。ハイブリダイゼーションは、モレキュラー・クロニング第2版、カレント・プロトコールズ・イン・モレキュラー・バイオロジー、DNA Cloning 1: Core Techniques, A Practical Approach, Second Edition, Oxford University Press (1995)等に記載されている方法に準じて行うことができる。ハイブリダイズ可能なDNAとしては、具体的にはBLAST、FASTA等の解析ソフトを用いて計算したときに、上記の（a）に記載のDNAと少なくとも60%以上の相同性を有するDNA、好ましくは80%以上の相同性を有するDNA、より好ましくは95%以上の相同性を有するDNAをあげることができる。

【0025】本発明の部分ペプチドをコードするDNAとしては、本発明の部分ペプチドをコードするDNAであればいかなるものであってもよく、具体例として（a）配列番号2に記載の塩基配列において塩基番号175～1287番で表される塩基配列から選ばれる部分塩基配列を有するDNAであり、かつ配列番号1に記載のアミノ酸配列を有するポリペプチドのリガンド、アゴニスト、アンタゴニストまたは機能修飾物質との結合能を有する部分ペプチドをコードするDNA、（b）本発明のポリペプチドをコードするDNAとストリンジントな条件でハイブリダイズするDNAを表す塩基配列から選ばれる部分塩基配列を有するDNAであり、かつ配列番号1に記載のアミノ酸配列を有するポリペプチドのリガンド、アゴニスト、アンタゴニストまたは機能修飾物質との結合能を有するペプチドをコードするDNA、をあげることができる。

【0026】本発明の部分ペプチドをコードするDNAとは、本発明のポリペプチドのリガンド、アゴニスト、アンタゴニストまたは機能修飾物質との結合能を有する、本発明のポリペプチドの部分ペプチドをコードするDNAであり、例えば、上記（1）に記載の方法で予測した細胞外領域または膜結合領域を含む部分ペプチドをコードするDNAをあげることができる。具体的には配列番号1で表わされるアミノ酸配列の第1番目～第49番目、第107番目～第121番目、第187番目～第208番目または第298番目～第309番目のアミノ酸配列を有する部分ペプチドをコードするDNAである、配列番号2で表わされる塩基配列の第175番目～第321番目、第493番目～第537番目、第733番目～第798番目または第1066番目～第1101番目の塩基配列を有するDNAをあげることができる。また、配列番号1で表わされるアミノ酸配列の第50番目～第75番目、第81番目～第106番目、第122番目～第147番目、第161番目～第186番目、第

209番目～第234番目、第272番目～第297番目または第310番目～第335番目のアミノ酸配列を有する部分ペプチドをコードするDNAである、配列番号2で表される塩基配列の第322番目～第399番目、第415番目～第492番目、第538番目～第615番目、第655番目～第732番目、第799番目～第876番目、第988番目～第1065番目または第1102番目～第1179番目の塩基配列をあげることができる。また、本発明の部分ペプチドをコードするDNAは、個々の部分ペプチドを個別にコードするDNAであっても良いし、個々の部分ペプチドをコードするDNAを同時に複数含むDNAであっても良い。

【0027】(3)本発明のポリペプチドをコードするDNAの取得、ならびに該DNAおよびオリゴヌクレオチドの製造

本発明のポリペプチドをコードするDNAは、例えば、ヒトや哺乳動物(例えば、モルモット、ラット、マウス、ニワトリ、ウサギ、ブタ、ヒツジ、ウシ、サルなど)のあらゆる細胞(例えば、脾細胞、神経細胞、グリア細胞、脾臓β細胞、骨髄細胞、メサングウム細胞、ランゲルハンス細胞、表皮細胞、上皮細胞、内皮細胞、繊維芽細胞、繊維細胞、筋細胞、脂肪細胞、免疫細胞

(例、マクロファージ、T細胞、B細胞、ナチュラルキラー細胞、肥満細胞、好中球、好塩基球、好酸球、単球)、巨核球、滑膜細胞、軟骨細胞、骨細胞、骨芽細胞、破骨細胞、乳腺細胞、肝細胞もしくは間質細胞、またはこれら細胞の前駆細胞、幹細胞もしくはガン細胞など)、またはそれらの細胞が存在するあらゆる組織、例えば、脳、脳の各部位(例、嗅球、扁桃核、大脳基底核、海馬、視床、視床下部、視床下核、大脳皮質、延髄、小脳、後頭葉、前頭葉、側頭葉、被殻、尾状核、脳梁、黒質)、脊髄、下垂体、胃、脾臓、腎臓、肝臓、生殖腺、甲状腺、胆のう、骨髄、副腎、皮膚、筋肉、肺、消化管、血管、心臓、胸腺、脾臓、顎下腺、末梢血、末梢血球、腸管、前立腺、睾丸、精巣、卵巣、胎盤、子宮、骨、関節、小腸、大腸、骨格筋など(特に、脳や脳の各部位)に由来するゲノムDNA、ゲノムDNAライブラリー、上記の細胞や組織由来のcDNA、またはcDNAライブラリー等から選ばれる各々のゲノムDNAまたはcDNAをランダムにシーケンシングして得ることができる。

【0028】ゲノムDNAの調製、ゲノムDNAライブラリーの作製は、例えば上記各種細胞、器官または組織を用いて常法に従い行うことができる。具体的方法としてはモレキュラー・クローニング第2版やカレント・プロトコルズ・イン・モレキュラー・バイオロジーに記載された方法をあげることができる。

【0029】cDNAおよびcDNAライブラリーの作製は、例えば、上記各種細胞、器官または組織由来のmRNAを用いて、常法により作製できる。具体的には、

モレキュラー・クローニング第2版やカレント・プロトコルズ・イン・モレキュラー・バイオロジー、DNA Cloning 1: Core Techniques, A Practical Approach, Second Edition, Oxford University Press (1995)等に記載された方法、完全長cDNA作製法[Methods in Enzymology, 303, 19 (1999)、Gene, 138, 171 (1994)]、あるいは市販のキット、例えばスーパースクリプト・プラスミド・システム・フォー・cDNA・シンセシス・アンド・プラスミド・クローニング[SuperScript Plasmid System for cDNA Synthesis and Plasmid Cloning; ギブコBRL (Gibco BRL) 社製]やザップー・cDNA・シンセシス・キット[ZAP-cDNA Synthesis Kit, ストラタジーン社製]を用いて作製できる。

【0030】ライブラリーを作製するためのクローニングベクターとしては、大腸菌K12株中で自立複製できるものであれば、ファージベクター、プラスミドベクター等いずれでも使用できる。具体的には、ZAP Express [ストラタジーン社製, Strategies, 5, 58 (1992)]、pBluescript II SK(+) [Nucleic Acids Research, 17, 9494 (1989)]、λzap II (ストラタジーン社製)、λgt10、λgt11 [DNA Cloning, A Practical Approach, 1, 49 (1985)]、λTriplEx (クローンテック社製)、λExCell (ファルマシア社製)、pT7318U (ファルマシア社製)、pCD2 [Mol. Cell. Biol., 3, 280 (1983)]、pUC18 [Gene, 33, 103 (1985)]、pAMo [J. Biol. Chem., 268, 22782-22787 (1993)、別名pAMoPRC3Sc (特開平05-336963)]、pAMo-d (実施例1参照)等をあげることができる。

【0031】ライブラリーの作製に用いる宿主微生物としては、大腸菌に属する微生物であればいずれでも用いることができる。具体的には、Escherichia coli XL1-B lueMRF' [ストラタジーン社製, Strategies, 5, 81 (1992)]、Escherichia coli C600 [Genetics, 39, 440 (1954)]、Escherichia coli Y1088 [Science, 222, 778 (1983)]、Escherichia coli Y1090 [Science, 222, 778 (1983)]、Escherichia coli NM522 [J. Mol. Biol., 166, 1 (1983)]、Escherichia coli K802 [J. Mol. Biol., 16, 118 (1966)]、Escherichia coli JM105 [Gene, 38, 275 (1985)]、Escherichia coli SOLR™ Strain (ストラタジーン社より市販)およびE. coli LE392 (モレキュラー・クローニング第2版)等を用いることができる。

【0032】より具体的なcDNAライブラリーの作製方法としては以下の方法があげられる。

【0033】ヒト胃癌細胞KATOIIIから、モレキュラー・クローニング第2版記載の方法に準じてmRNAを抽出し、オリゴキャップ法[Gene, 138, 171 (1994)]によりcDNAを合成する。次に、蛋白質 核酸 酵素, 41, 197 (1996)、Gene, 138, 171 (1994)記載の方法により第一鎖cDNAを合成した後、該cDNAの5'末端

側と3'末端側に設計したプライマーを用いてpolymerase chain reaction〔モレキュラー・クローニング第2版およびPCR Protocols Academic Press(1990)、以下PCRと略す〕により2本鎖cDNAに変換する。該cDNAは制限酵素SfiIで切断し、DraIで切断したクローニングベクター pME18SFL3(GenBank AB009864, Expression vector, 3392bp)に連結することで、cDNAライブラリーを作製できる。

【0034】cDNAの塩基配列は、cDNAライブラリーを構成する各大腸菌クローンをランダムに選び、該クローンよりプラスミドDNAを調製し、該プラスミドに含有されるcDNAの両末端側の塩基配列を、通常用いられる塩基配列解析方法、例えばサンガー(Sanger)らのジデオキシ法〔Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 74, 5463 (1977)〕あるいは373A・DNAシーケンサー(Perkin Elmer社製)等の塩基配列分析装置を用いて決定することができる。

【0035】このようにして得られた塩基配列と相同性のある遺伝子、あるいは該塩基配列がコードするアミノ酸配列と相同性を有する蛋白質の存在をデータベース検索により調べる。検索には、Blast、FrameSearch法(CompuGen社製)等のプログラムを利用することができる。データベースとしては、GenBank等の公的なデータベースを利用することもでき、私的なデータベースも利用できる。該検索により、塩基レベルまたはアミノ酸レベルで既知のGPCRと相同性を示したcDNAに関しては、全塩基配列を決定し、該cDNAにコードされるポリペプチドの全アミノ酸配列を明らかにする。

【0036】該cDNAが完全長のポリペプチドをコードしていない場合は、以下のようにして完全長のポリペプチドをコードするcDNAを得ることができる。

【0037】各種臓器または各種細胞から調製した一本鎖cDNAライブラリーまたは上記記載の方法で作製できるcDNAライブラリーを鋳型にして、該cDNAに特異的なプライマーセットを用いてPCRを行うことにより、該cDNAに対応する遺伝子を発現する臓器や細胞を特定し、特定された臓器あるいは細胞由来のcDNAライブラリーに対し、該cDNAをプローブにしてコロニーハイブリダイゼーション法(モレキュラー・クローニング第2版)を行うことにより新たに該cDNAの全長を含むcDNAをcDNAライブラリーから選択することができる。

【0038】また、該cDNAに対応する遺伝子が発現している臓器または細胞由来の一本鎖cDNAライブラリーまたはcDNAライブラリーを鋳型として、5' RACE法と3' RACE法〔Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 85, 98 (1988)〕を行うことにより、該cDNAの5'末端側の断片と3'末端側の断片を取得し、両断片を連結することにより、全長cDNAを取得することもできる。また、市販のキット(例えばベーリンガー社製の5'/3' RA

CE kit)を用いて、5' RACE法と3' RACE法を行うこともできる。

【0039】各種臓器または各種細胞由来の一本鎖cDNAライブラリーは、常法または市販されているキットに従って作製することができるが、例えば以下に示すような方法で作製できる。

【0040】各種臓器または各種細胞からグアニジウムチオシアネートフェノールクロロホルム法〔Anal. Biochem., 162, 156 (1987)〕により全RNAを抽出する。必要に応じて、全RNAをデオキシリボヌクレアーゼI(Life Technologies社製)で処理し、混入の可能性がある染色体DNAを分解する。得られた全RNA各々について、オリゴ(dT)プライマーまたはランダムプライマーを用いてSUPERSCRIPT™ Preamplification System for First Strand cDNA System(Life Technologies社)により一本鎖cDNAライブラリーを作製できる。上記のようにして作製した一本鎖cDNAライブラリーとしては、例えばヒト視床から作製した一本鎖cDNAライブラリーをあげることができる。

【0041】上記のようにして取得した完全長のポリペプチドをコードするcDNAの全塩基配列を決定し、該ポリペプチドのアミノ酸配列について、再度上記と同様にしてデータベース検索を行い、既知のGPCRとの相同性を調べることができる。また、該ポリペプチドのアミノ酸配列を用いて疎水性プロット解析を行い、該ポリペプチドがGPCRに共通する7回膜貫通領域を有するかを調べ、該ポリペプチドが7回膜貫通領域を有し、かつ既知のGPCRと相同性を示せば、該ポリペプチドはGPCRであると考えることができる。該ポリペプチドが既知GPCRとは異なる場合、該ポリペプチドは新規GPCRであると考えることができる。

【0042】また、決定された新規ポリペプチドのアミノ酸配列に基づいて、該ポリペプチドをコードするDNAを化学合成することによっても目的のDNAを調製することができる。DNAを化学合成は、チオホスファイト法を利用した島津製作所社製のDNA合成機、フォスフォアミダイト法を利用したパーキン・エルマー社製のDNA合成機model 392等を用いて行うことができる。

【0043】後述のオリゴヌクレオチドをセンスプライマーおよびアンチセンスプライマーとして用い、これらDNAに相補的なmRNAを発現している細胞のmRNAから調製したcDNAを鋳型として、PCRを行うことによっても、目的とするDNAを調製することができる。

【0044】上記の方法により取得される新規G蛋白質共役型受容体ポリペプチドをコードするDNAとして、例えば、配列番号1で表されるポリペプチドをコードするDNA等をあげることができ、具体的には、配列番号2に記載の塩基配列において塩基番号175~1287

番で表される塩基配列を有するDNA等をあげることができる。配列番号2に記載の塩基配列において塩基番号175～1287番で表される塩基配列を有するDNAがコードするポリペプチドは、ハイドロパシー解析、膜結合領域予測解析解析方法、および ENBO J., 12, 1693 (1993)記載の方法により、以下の構造からなると予想される(図1、および図2～10参照)。N末端の細胞外領域(49アミノ酸)、第一膜貫通領域(26アミノ酸)、第一細胞内ループ(5アミノ酸)、第二膜貫通領域(26アミノ酸)、第一細胞外ループ(15アミノ酸)、第三膜貫通領域(26アミノ酸)、第二細胞内ループ(13アミノ酸)、第四膜貫通領域(26アミノ酸)、第二細胞外ループ(22アミノ酸)、第五膜貫通領域(26アミノ酸)、第三細胞内ループ(37アミノ酸)、第六膜貫通領域(26アミノ酸)、第三細胞外ループ(12アミノ酸)、第七膜貫通領域(26アミノ酸)、C末端の細胞内領域(36アミノ酸)。

【0045】アミノ酸配列のハイドロパシー解析により、該ポリペプチドはシグナルペプチドを有していないと考えられる(図1参照)。

【0046】配列番号2に記載の塩基配列を有するDNAを含むプラスミドとしては、例えば、pBS-KATO06734Lをあげることができる。pBS-KATO06734Lを保有する大腸菌 *Escherichia coli* DH5 α /pBS-KATO06734LはFERM B P-6967として平成11年12月8日付けで工業技術院生命工学工業技術研究所、日本国茨城県つくば市東1丁目1番3号(郵便番号305-8566)に寄託されている。

【0047】上記の方法で取得した本発明のDNAおよびDNA断片を用いて、モレキュラー・クローニング第2版等に記載の常法により、あるいは該DNAの塩基配列情報を用いてDNA合成機により、本発明のDNAの一部の配列を有するアンチセンス・オリゴヌクレオチド、センス・オリゴヌクレオチド等のオリゴヌクレオチドを調製することができる。

【0048】該オリゴヌクレオチドとしては、本発明のDNAの塩基配列中の連続した5～60塩基と同じ塩基配列を有するDNAまたは該DNAと相補的な配列を有するDNAをあげることができ、具体的には、配列番号2に記載のDNAの塩基配列中の連続した5～60塩基と同じ配列を有するDNAまたは該DNAと相補的な配列を有するDNAをあげることができる。センスプライマーおよびアンチセンスプライマーとして用いる場合には、両者の融解温度(T_m)および塩基数が極端に変わらないオリゴヌクレオチドを選択することが好ましい。具体的には、例えば配列番号11および配列番号12で表される塩基配列を有するオリゴヌクレオチドのプライマーセット、配列番号11および配列番号17で表される塩基配列を有するオリゴヌクレオチドのプライマーセッ

ト、または配列番号13および配列番号14で表される塩基配列を有するオリゴヌクレオチドのプライマーセットをあげることができる。

【0049】更に、これらオリゴヌクレオチドの誘導体(以下、オリゴヌクレオチド誘導体という)も本発明のオリゴヌクレオチドとして利用することができる。該オリゴヌクレオチド誘導体としては、オリゴヌクレオチド中のリン酸ジエステル結合がホスフォロチオエート結合に変換されたオリゴヌクレオチド誘導体、オリゴヌクレオチド中のリン酸ジエステル結合がN3'-P5' ホスフォアミデート結合に変換されたオリゴヌクレオチド誘導体、オリゴヌクレオチド中のリボースとリン酸ジエステル結合がペプチド核酸結合に変換されたオリゴヌクレオチド誘導体、オリゴヌクレオチド中のウラシルがC-5プロピニルウラシルで置換されたオリゴヌクレオチド誘導体、オリゴヌクレオチド中のウラシルがC-5チアゾールウラシルで置換されたオリゴヌクレオチド誘導体、オリゴヌクレオチド中のシトシンがC-5プロピニルシトシンで置換されたオリゴヌクレオチド誘導体、オリゴヌクレオチド中のシトシンがフェノキサジン修飾シトシン(phenoxazine-modified cytosine)で置換されたオリゴヌクレオチド誘導体、オリゴヌクレオチド中のリボースが2'-O-プロピルリボースで置換されたオリゴヌクレオチド誘導体、あるいはオリゴヌクレオチド中のリボースが2'-メトキシエトキシリボースで置換されたオリゴヌクレオチド誘導体等をあげることができる〔細胞工学, 16, 1463 (1997)〕。

(4) 本発明のポリペプチドおよび部分ペプチドの製造法

本発明のポリペプチドまたはその塩は、前述したヒトや哺乳動物の細胞または組織から公知の蛋白質の精製方法によって製造することもできるし、後述する本発明のポリペプチドをコードするDNAを含有する形質転換体を用いても製造することができる。また、後述のペプチド合成法に準じて製造することもできる。ヒトや哺乳動物の組織または細胞から製造する場合、例えばヒトや哺乳動物の組織または細胞をホモジナイズした後、酸などで抽出を行ない、該抽出液を逆相クロマトグラフィー、イオン交換クロマトグラフィーなどのクロマトグラフィーを組み合わせてることにより単離・精製することができる。

【0050】本発明の部分ペプチドまたはその塩は、公知のペプチドの合成法に従って合成することもできるし、あるいは本発明のG蛋白質共役型受容体ポリペプチドを適当なペプチダーゼで切断することによっても製造することができる。ペプチドの合成法としては、例えば、固相合成法、液相合成法のいずれによっても良い。すなわち、本発明の部分ペプチドを構成し得る部分ペプチドもしくはアミノ酸と残余部分とを縮合させ、生成物が保護基を有する場合は保護基を脱離することにより目

的のペプチドを製造することができる。公知の縮合方法や保護基の脱離としては、例えば、以下の(a)～

(e)に記載された方法が挙げられる。

(a) M. Bodanszky および M.A. Ondetti、ペプチドシンセシス (Peptide Synthesis), Interscience Publishers, New York (1966年)

(b) SchroederおよびLuebke、ザ ペプチド(The Peptide), Academic Press, New York (1965年)

(c) 泉屋信夫他、ペプチド合成の基礎と実験、丸善(株) (1975年)

(d) 矢島治明 および榊原俊平、生化学実験講座 1、タンパク質の化学IV、205、(1977年)

(e) 矢島治明監修、続医薬品の開発 第14巻 ペプチド合成 広川書店

また、反応後は通常の精製法、例えば、溶媒抽出・蒸留・カラムクロマトグラフィー・液体クロマトグラフィー・再結晶などを組み合わせて本発明の部分ペプチドを精製単離することができる。上記方法で得られる部分ペプチドが遊離体である場合は、公知の方法によって適当な塩に変換することができるし、逆に塩で得られた場合は、公知の方法によって遊離体に変換することができる。

【0051】また上記方法以外にも上記(3)で得られた本発明のDNAを宿主細胞中で発現させることにより、本発明のポリペプチドまたは部分ペプチドを製造することができる。

【0052】即ち、本発明のDNAを適当な発現ベクターのプロモーター下流に挿入した組換え体DNAを造成し、該組換え体DNAを宿主細胞に導入することにより、本発明のポリペプチドまたは部分ペプチドを発現する形質転換体を取得し、該形質転換体を培養することにより、本発明のポリペプチドまたは部分ペプチドを製造することができる。

【0053】宿主細胞としては、原核細胞、酵母、動物細胞、昆虫細胞、植物細胞等、目的とする遺伝子を発現できるものであればいずれも用いることができる。また、動物個体や植物個体を用いることもできる。

【0054】発現ベクターとしては、上記宿主細胞において自立複製が可能、または染色体中への組込みが可能で、本発明のDNAの転写に適した位置にプロモーターを含有しているものを用いることができる。

【0055】細菌等の原核生物を宿主細胞として用いる場合、本発明のDNAの発現ベクターは、原核生物中で自立複製可能であると同時に、プロモーター、リボソーム結合配列、新規受容体遺伝子、転写終結配列、より構成されていることが好ましい。プロモーターを制御する遺伝子が含まれていてもよい。

【0056】発現ベクターとしては、例えば、pBTrp 2、pBTac1、pBTac2 (いずれもベーリンガーマンハイム社より市販)、pSE280 (インビ

ロジェン社製)、pGEMEX-1 (Promega社製)、pQE-8 (QIAGEN社製)、pKYP10 (特開昭58-110600)、pKYP200 [Agric. Biol. Chem., 48, 669 (1984)]、pLSA1 [Agric. Biol. Chem., 53, 277 (1989)]、pGEL1 [Proc. Natl. Acad. Sci., USA, 82, 4306 (1985)]、pBluescript II SK (-) (STRATAGENE社)、pTrs30 (FERM BP-5407)、pTrs32 (FERM BP-5408)、pGHA2 (FERM BP-400)、pGKA2 (FERM B-6798)、pTerm2 (特開平3-22979、US4686191、US4939094、US5160735)、pKK233-2 (Pharmacia社製)、pGEX (Pharmacia社製)、pETシステム (Novagen社製)、pSupex、pUB110、pTP5、pC194、pTrxFus (Invitrogen社)、pMAL-c2 (New England Biolabs社)等を用いることができる。

【0057】プロモーターとしては、大腸菌等の宿主細胞中で発現できるものであればいかなるものでもよい。例えば、trpプロモーター (P_{trp})、lacプロモーター (P_{lac})、P_Lプロモーター、P_Rプロモーター等の、大腸菌やファージ等に由来するプロモーター、SPO1プロモーター、SPO2プロモーター、penPプロモーター等をあげることができる。またP_{trp}を2つ直列させたプロモーター (P_{trp} x 2)、tacプロモーター、lacT7プロモーター、let Iプロモーターのように人為的に設計改変されたプロモーター等も用いることができる。

【0058】リボソーム結合配列としては、シャイン・ダルガノ (Shine-Dalgarno) 配列と開始コドンとの間を適当な距離 (例えば6～18塩基) に調節したプラスミドを用いることが好ましい。

【0059】本発明のDNAの発現には転写終結配列は必ずしも必要ではないが、好適には構造遺伝子直下に転写終結配列を配置することが望ましい。

【0060】宿主細胞としては、エシェリヒア属、セラチア属、バチルス属、プレビバクテリウム属、コリネバクテリウム属、ミクロバクテリウム属、シュドモナス属等に属する微生物、例えば、Escherichia coli XL1-Blue、Escherichia coli XL2-Blue、Escherichia coli DH1、Escherichia coli MC1000、Escherichia coli KY3276、Escherichia coli W1485、Escherichia coli JM109、Escherichia coli HB101、Escherichia coli No.49、Escherichia coli W3110、Escherichia coli NY49、Escherichia coli BL21(DE3)、Escherichia coli BL21(DE3)pLysS、Escherichia coli HMS174(DE3)、Escherichia coli HMS174(DE3)pLysS、Serratia ficaria、Serratia fonticola、Serratia liquefaciens、Serratia marcescens、Bacillus subtilis、Bacillus amyloliquefaciens、Corynebacterium ammoniagenes、Brevibacterium

immariophilum ATCC14068、Brevibacterium saccharol
yticum ATCC14066、Corynebacterium glutamicum ATCC13
032、Corynebacterium glutamicum ATCC14067、Coryneb
acterium glutamicum ATCC13869、Corynebacterium ace
toacidophilum ATCC13870、Microbacterium ammoniaphi
lum ATCC15354、Pseudomonas sp. D-0110等をあげるこ
とができる。

【0061】組換えベクターの導入方法としては、上記
宿主細胞へDNAを導入する方法であればいずれも用い
ることができ、例えば、エレクトロポレーション法〔Nu
cleic Acids Res., 16, 6127 (1988)〕、カルシウムイ
オンを用いる方法〔Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 69,
2110 (1972)〕、プロトプラスト法 (特開昭63-24839
4)、Gene, 17, 107 (1982)やMolecular & General Gen
etics, 168, 111 (1979)に記載の方法等をあげることが
できる。

【0062】酵母菌株を宿主細胞として用いる場合に
は、発現ベクターとして、例えば、YEp13 (ATCC37
115)、YEp24 (ATCC37051)、YCp50 (ATCC37
419)、pHS19、pHS15等を例示することができ
る。プロモーターとしては、酵母菌株中で発現できる
ものであればいかなるものでもよく、例えば、PHO5
プロモーター、PGKプロモーター、GAPプロモータ
ー、ADHプロモーター、gal1プロモーター、gal10
プロモーター、ヒートショック蛋白質プロモ
ーター、MFα1プロモーター、CUP1プロモータ
ー等のプロモーターをあげることができる。

【0063】宿主細胞としては、サッカロマイセス属、
シゾサッカロマイセス属、クルイベロミセス属、トリコ
スポロン属、シワニオミセス属等に属する酵母菌株をあ
げることができ、具体的には、Saccharomyces cerevisi
ae、Schizosaccharomyces pombe、Kluyveromyces lacti
s、Trichosporon pullulans、Schwanniomyces alluvius
等をあげることができる。またGPCRの発現に適した
変異株を用いることもできる〔Trends in Biotechnolog
y, 15, 487 (1997)、Mol. Cell. Biol., 15, 6188 (199
5)、Mol. Cell. Biol., 16, 4700 (1996)〕。

【0064】組換えベクターの導入方法としては、酵母
にDNAを導入する方法であればいずれも用いることが
でき、例えば、エレクトロポレーション法〔Methods. i
n Enzymol., 194, 182 (1990)〕、スフェロプラスト法
〔Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 84, 1929 (1978)〕、
酢酸リチウム法〔J. Bacteriol., 153, 163 (1983)〕、
Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 75, 1929 (1978)記載の
方法等をあげることができる。

【0065】動物細胞を宿主細胞として用いる場合に
は、発現ベクターとして、例えば、pCDNA1/Amp、
pCDNA1、pCDM8、pAGE107、pREP4、pAGE103、
pAMO、pAMO A、pAMO-d (実施例1参照)、pAS3-3
等を例示する

ことができる。

【0066】プロモーターとしては、動物細胞中で発現
できるものであればいずれも用いることができ、例え
ば、サイトメガロウイルス (ヒトCMV) のIE (imme
diateearly) 遺伝子のプロモーター、SV40の初期プ
ロモーター、モロニー・ミュリン・ロイケミア・ウイル
ス (Moloney Murine Leukemia Virus) のロング・ター
ミナル・リピート・プロモーター (Long Terminal Repe
at Promoter)、レトロウイルスのプロモーター、ヒー
トショックプロモーター、SRαプロモーター、あるい
はメタロチオネインのプロモーター等をあげることがで
きる。また、ヒトCMVのIE遺伝子のエンハンサーを
プロモーターと共に用いてもよい。

【0067】宿主細胞としては、マウス・ミエローマ細
胞、ラット・ミエローマ細胞、マウス・ハイブリドマ
細胞、CHO細胞、BHK細胞、アフリカミドリザル腎臓細
胞、Namalwa細胞、Namalwa KJM-1細胞、ヒト胎児腎臓細
胞、ヒト白血病細胞、HBT5637 (特開昭63-299)、ヒト
大腸癌細胞株、カエルの卵母細胞およびカエルのメラニ
ン細胞等をあげることができる。

【0068】さらにマウス・ミエローマ細胞としては、
SP2/0、NS0等、ラット・ミエローマ細胞としてはYB2/0
等、ヒト胎児腎臓細胞としてはHEK293等、ヒト白血病細
胞としてはBALL-1等、アフリカミドリザル腎臓細胞とし
てはCOS-1、COS-7、ヒト大腸癌細胞株としてはHCT-15等
をあげることができる。

【0069】組換えベクターの導入方法としては、動物
細胞にDNAを導入する方法であればいずれも用いるこ
とができ、例えば、エレクトロポレーション法〔Cytote
chnology, 3, 133 (1990)〕、リン酸カルシウム法 (特
開平2-227075)、リポフェクション法〔Proc. Natl. Ac
ad. Sci. USA, 84, 7413 (1987)〕、Virology, 52, 456
(1973)に記載の方法等をあげることができる。形質転
換体の取得および培養は、特開平2-227075号公
報あるいは特開平2-257891号公報に記載されて
いる方法に準じて行なうことができる。

【0070】昆虫細胞を宿主として用いる場合には、例
えば、バキュロウイルス・イクスプレッション・ベクタ
ーズ ア・ラボラトリー・マニュアル〔Baculovirus Exp
ression Vectors, A Laboratory Manual, W. H. Freema
n and Company, New York (1992)〕、モレキュラー・バ
イオロジー ア・ラボラトリー・マニュアル (Molecular
Biology, A Laboratory Manual)、カレント・プロト
コールズ・イン・モレキュラー・バイオロジー、Bio/T
echnology, 6, 47 (1988)等に記載された方法によっ
て、ポリペプチドを発現することができる。

【0071】即ち、組換え遺伝子導入ベクターおよびバ
キュロウイルスを昆虫細胞に共導入して昆虫細胞培養上
清中に組換えウイルスを得た後、さらに組換えウイルス
を昆虫細胞に感染させ、ポリペプチドを発現させること

ができる。

【0072】該方法において用いられる遺伝子導入ベクターとしては、例えば、pVL1392、pVL1393、pBlueBacII I (すべてインビトロジェン社製) 等をあげることができる。

【0073】バキュロウイルスとしては、例えば、夜盗蛾科昆虫に感染するウイルスであるアウトグラフィ・カリフォルニカ・ヌクレアー・ポリヘドロシス・ウイルス (Autographa californica nuclear polyhedrosis virus) 等を用いることができる。

【0074】昆虫細胞としては、*Spodoptera frugiperda* の卵巣細胞、*Trichoplusia ni* の卵巣細胞、カイコ卵巣由来の培養細胞等を用いることができる。*Spodoptera frugiperda* の卵巣細胞としてはSf9、Sf21 (バキュロウイルス・イクスプレッション・ベクターズ ア・ラボラトリー・マニュアル) 等、*Trichoplusia ni* の卵巣細胞としてはHigh 5、BTI-TN-5B1-4 (インビトロジェン社製) 等、カイコ卵巣由来の培養細胞としては*Bombyx mori* N4等をあげることができる。

【0075】組換えウイルスを調製するための、昆虫細胞への上記組換え遺伝子導入ベクターと上記バキュロウイルスの共導入方法としては、例えば、リン酸カルシウム法 (特開平2-227075)、リポフェクション法 [Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 84, 7413 (1987)] 等をあげることができる。

【0076】また、動物細胞にDNAを導入する方法と同様の方法を用いて、昆虫細胞にDNAを導入することもでき、例えば、エレクトロポレーション法 [Cytotechnology, 3, 133 (1990)]、リン酸カルシウム法 (特開平2-227075)、リポフェクション法 [Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 84, 7413 (1987)] 等をあげることができる。

【0077】植物細胞または植物個体を宿主として用いる場合には、公知の方法 [組織培養, 20 (1994)、組織培養, 21 (1995)、Trends in Biotechnology, 15, 45 (1997)] に準じてポリペプチドを生産することができる。

【0078】遺伝子発現に用いるプロモーターとしては、植物細胞中で発現できるものであればいずれも用いることができ、例えば、カリフラワーモザイクウイルス (CaMV) の35Sプロモーター、イネアクチン1プロモーター等をあげることができる。また、プロモーターと発現させる遺伝子の間に、トウモロコシのアルコール脱水素酵素遺伝子のイントロン1等を挿入することにより、遺伝子の発現効率をあげることもできる。

【0079】宿主細胞としては、ジャガイモ、タバコ、トウモロコシ、イネ、アブラナ、大豆、トマト、小麦、大麦、ライ麦、アルファルファ、亜麻等の植物細胞等をあげることができる。

【0080】組換えベクターの導入方法としては、植物細胞にDNAを導入する方法であればいずれも用いるこ

とができ、例えば、アグロバクテリウム (*Agrobacterium*) (特開昭59-140885、特開昭60-70080、WO94/00977)、エレクトロポレーション法 [Cytotechnology, 3, 133 (1990)、特開昭60-251887]、パーティクルガン (遺伝子銃) を用いる方法 (特許第2606856、特許第2517813) 等をあげることができる。

【0081】遺伝子を導入した植物の細胞や器官は、ジャーファーマンターを用いて大量培養することができる。また、遺伝子導入した植物細胞を再分化させることにより、遺伝子が導入された植物個体 (トランスジェニック植物) を造成することもできる。

【0082】動物個体を用いて本発明のポリペプチドを生産することもできる。例えば、公知の方法 [American Journal of Clinical Nutrition, 63, 639S (1996)、American Journal of Clinical Nutrition, 63, 627S (1996)、Bio/Technology, 9, 830 (1991)] に準じて、遺伝子を導入した動物中に本発明のポリペプチドを生産することができる。

【0083】プロモーターとしては、動物で発現できるものであればいずれも用いることができるが、例えば、乳腺細胞特異的なプロモーターである α カゼインプロモーター、 β カゼインプロモーター、 β ラクトグロブリンプロモーター、ホエー酸性プロテインプロモーター等が好適に用いられる。

【0084】本発明のポリペプチドまたは部分ペプチドをコードするDNAを組み込んだ組換え体DNAを保有する微生物、動物細胞、あるいは植物細胞由来の形質転換体を、通常の培養方法に従って培養し、該ポリペプチドを生成蓄積させ、該培養物より該ポリペプチドを採取することにより、該ポリペプチドを製造することができる。

【0085】形質転換体が動物個体または植物個体の場合は、通常の方法に従って、飼育または栽培し、該ポリペプチドを生成・蓄積させ、該動物個体または植物個体より該ポリペプチドを採取することにより、該ポリペプチドを製造することができる。

【0086】即ち、動物個体の場合、例えば、本発明のDNAを保有する非ヒトトランスジェニック動物を飼育し、該組換え体DNAのコードする本発明のポリペプチドまたは部分ペプチドを該動物中に生成・蓄積させ、該動物中より該ポリペプチドまたは部分ペプチドを採取することにより、本発明のポリペプチドまたは部分ペプチドを製造することができる。該動物中の生成・蓄積場所としては、例えば、各種細胞の細胞膜画分、該動物のミルク、卵等をあげることができる。

【0087】植物個体の場合、例えば、本発明のDNAを保有するトランスジェニック植物を栽培し、該組換え体DNAのコードする本発明のポリペプチドまたは部分ペプチドを該植物中に生成・蓄積させ、該植物中より該ポリペプチドまたは部分ペプチドを採取することによ

り、本発明のポリペプチドまたは部分ペプチドを製造することができる。

【0088】本発明のポリペプチドまたは部分ペプチドの製造用形質転換体が大腸菌等の原核生物、酵母菌等の真核生物である場合、これら生物を培養する培地は、該生物が資化し得る炭素源、窒素源、無機塩類等を含有一し、形質転換体の培養を効率的に行える培地であれば天然培地、合成培地のいずれでもよい。

【0089】炭素源としては、該形質転換体が資化し得るものであればよく、グルコース、フラクトース、スクロース、これらを含む糖蜜、デンプンあるいはデンプン加水分解物等の炭水化物、酢酸、プロピオン酸等の有機酸、エタノール、プロパノール等のアルコール類が用いられる。

【0090】窒素源としては、アンモニア、塩化アンモニウム、硫酸アンモニウム、酢酸アンモニウム、リン酸アンモニウム等の各種無機酸や有機酸のアンモニウム塩、その他含窒素化合物、並びに、ペプトン、肉エキスを、酵母エキス、コーンステープリカー、カゼイン加水分解物、大豆粕および大豆粕加水分解物、各種発酵菌体およびその消化物等が用いられることができる。

【0091】無機塩としては、リン酸第一カリウム、リン酸第二カリウム、リン酸マグネシウム、硫酸マグネシウム、塩化ナトリウム、硫酸第一鉄、硫酸マンガン、硫酸銅、炭酸カルシウム等を用いることができる。

【0092】培養は、振盪培養または深部通気攪拌培養等の好気的条件下で行う。培養温度は15～40℃がよく、培養時間は、通常16～96時間である。培養中pHは、3.0～9.0に保持する。pHの調整は、無機あるいは有機の酸、アルカリ溶液、尿素、炭酸カルシウム、アンモニア等を用いて行う。

【0093】また培養中に必要に応じて、アンピシリンやテトラサイクリン等の抗生物質を培地に添加してもよい。

【0094】プロモーターとして誘導性のプロモーターを用いた発現ベクターで形質転換した微生物を培養するときには、必要に応じてインデューサーを培地に添加してもよい。例えば、*lac*プロモーターを用いた発現ベクターで形質転換した微生物を培養するときにはイソプロピル-β-D-チオガラクトピラノシド (IPTG) 等を、*trp*プロモーターを用いた発現ベクターで形質転換した微生物を培養するときにはインドールアクリル酸 (IAA) 等を培地に添加してもよい。

【0095】本発明のポリペプチドまたは部分ペプチドの製造用形質転換体が動物細胞である場合、該細胞を培養する培地は、一般に使用されているRPMI 1640培地 [The Journal of the American Medical Association, 199, 519 (1967)]、EagleのMEM培地 [Science, 122, 501 (1952)]、DMEM培地 [Virology, 8, 396 (1959)]、199培地 [Proceeding of the Soc

ety for the Biological Medicine, 73, 1 (1950)] またはこれら培地に牛胎児血清等を添加した培地等を用いることができる。

【0096】培養は、通常pH6～8、30～40℃、5%CO₂存在下等の条件下で1～7日間行う。

【0097】また培養中に必要に応じて、カナマイシン、ペニシリン等の抗生物質を培地に添加してもよい。

【0098】昆虫細胞を宿主細胞として得られた形質転換体を培養する培地としては、一般に使用されているT_{NM}-F_H培地 (Pharmingen社製)、Sf-900 II SFM培地 (ギブコBRL社製)、ExCell 1400、ExCell 1405 (JRH Biosciences社製)、Grace's Insect Medium [Nature, 195, 788 (1962)] 等を用いることができる。

【0099】培養条件はpH6～7、培養温度は25～30℃、培養時間は通常1～5日間が好ましい。また、培養中に必要に応じて、ゲンタマイシン等の抗生物質を培地に添加してもよい。

【0100】本発明のポリペプチドまたは部分ペプチドは、直接発現させる以外に、モレキュラー・クローニング第2版に記載されている方法等に準じて、分泌タンパク質または融合タンパク質として発現させることもできる。融合させるタンパク質としては、β-ガラクトシダーゼ、プロテインA、プロテインAのIgG結合領域、クロラムフェニコール・アセチルトランスフェラーゼ、ポリ(Arg)、ポリ(Glu)、プロテインG、マルトース結合タンパク質、グルタチオンS-トランスフェラーゼ、ポリヒスチジン鎖 (His-tag)、Sペプチド、DNA結合タンパク質ドメイン、Tac抗原、チオレドキシン、グリーン・フルオレッセント・プロテイン、FLAGペプチド、および任意の抗体のエピトープなどがあげられる [山川彰夫, 実験医学, 13, 469-474 (1995)]。

【0101】本発明のポリペプチドまたは部分ペプチドの生産方法としては、宿主細胞内に生産させる方法、宿主細胞外に分泌させる方法、あるいは宿主細胞膜上に生産させる方法があり、使用する宿主細胞や、生産させるポリペプチドの構造を変えることにより、該方法を選択することができる。

【0102】宿主細胞外へ分泌発現させる場合、あるいは宿主細胞膜上に発現させる場合は、必要に応じて宿主に合ったシグナル配列を、本発明のポリペプチドまたは部分ペプチドのN末端側に付加する。該ポリペプチドまたは部分ペプチドのN末端を一部欠失させた上で、上記分泌シグナルを付加した方がよい場合もある。宿主がエシェリヒア属菌である場合は、アルカリフォスファターゼ・シグナル配列、OmpA・シグナル配列などが、宿主がバチルス属菌である場合は、α-アミラーゼ・シグナル配列、サブチリシン・シグナル配列などが、宿主が酵母である場合は、メイティングファクターα・シグナル

配列、インペルターゼ・シグナル配列など、宿主が動物細胞である場合には、インシュリン・シグナル配列、 α -インターフェロン・シグナル配列、抗体分子・シグナル配列などがそれぞれ利用できる。

【0103】本発明のポリペプチドまたは部分ペプチドに、精製または検出用のタグを付加して発現することができる。タグは任意の場所に付加することができるが、哺乳動物細胞で発現させる場合、上述した細胞外領域または細胞内領域に付加するのが好ましい。

【0104】精製・検出用のタグとしては、 β -ガラクトシダーゼ、プロテインA、プロテインAのIgG結合領域、クロラムフェニコール・アセチルトランスフェラーゼ、ポリ(Arg)、ポリ(Glu)、プロテインG、マルトース結合タンパク質、グルタチオンS-トランスフェラーゼ、ポリヒスチジン鎖(His-tag)、Sペプチド、DNA結合タンパク質ドメイン、Tac抗原、チオレドキシン、グリーン・フルオレッセント・プロテイン、FLAGペプチド、および任意の抗体のエピトープなどがあげられる〔山川彰夫、実験医学、13、469-474(1995)〕。

【0105】また、特開平2-227075に記載されている方法に準じて、ジヒドロ葉酸還元酵素遺伝子等を用いた遺伝子増幅系を利用して生産量を上昇させることもできる。

【0106】本発明のポリペプチドまたは部分ペプチドの製造用形質転換体の培養物から、本発明のポリペプチドを単離・精製するには、通常のポリペプチドの単離・精製法を用いることができる。

【0107】例えば、本発明のポリペプチドまたは部分ペプチドが本発明のポリペプチドまたは部分ペプチド製造用の形質転換体の細胞内に溶解状態で蓄積する場合には、培養物を遠心分離することにより、培養物中の細胞を集め、該細胞を洗浄した後に、超音波破碎機、フレンチプレス、マントンガウリンホモゲナイザー、ダイノミル等により細胞を破碎し、無細胞抽出液を得る。

【0108】該無細胞抽出液を遠心分離することにより得られた上清から、溶媒抽出法、硫酸等による塩析法脱塩法、有機溶媒による沈殿法、ジエチルアミノエチル(DEAE)-セファロース、DIAION HPA-75(三菱化成社製)等レジンを用いた陰イオン交換クロマトグラフィー法、S-Sepharose FF(ファルマシア社製)等のレジンを用いた陽イオン交換クロマトグラフィー法、ブチルセファロース、フェニルセファロース等のレジンを用いた疎水性クロマトグラフィー法、分子篩を用いたゲルろ過法、アフィニティークロマトグラフィー法、クロマトフォーカシング法、等電点電気泳動等の電気泳動法等の手法を用い、精製標品を得ることができる。

【0109】本発明のポリペプチドまたは部分ペプチドが本発明のポリペプチドまたは部分ペプチドの製造用の形質転換体の細胞膜上に蓄積する場合には、同様に細胞

を回収後破碎し、遠心分離やろ過により膜画分を得たのち、トリトンX-100などの界面活性剤を用いて該ポリペプチドまたは該部分ペプチドを膜から可溶化した後、上記と同様の単離・精製法により精製標品を得ることができる。

【0110】また、該ポリペプチドまたは該部分ペプチドが細胞内に不溶体を形成して発現した場合は、同様に細胞を回収後破碎し、遠心分離を行うことにより得られた沈殿画分より、通常の方法により該ポリペプチドまたは該部分ペプチドの不溶体を変性剤で可溶化する。該可溶化液を、変性剤を含まないあるいは変性剤の濃度がポリペプチドまたは該部分ペプチドが変性しない程度に希薄な溶液に希釈、あるいは透析し、該ポリペプチドまたは該部分ペプチドを正常な立体構造に構成させた後、上記と同様の単離・精製法により精製標品を得ることができる。

【0111】細胞外に該ポリペプチドまたは該部分ペプチドが分泌される場合には、該培養物を遠心分離等の手法により処理し、可溶性画分を取得する。該可溶性画分から、上記無細胞抽出液上清からの単離・精製法と同様の手法により、該ポリペプチドまたは該部分ペプチドの精製標品を得ることができる。

【0112】また、本発明のポリペプチドまたは該部分ペプチドを他のタンパク質との融合タンパク質として生産し、融合したタンパク質に親和性をもつ物質を用いたアフィニティークロマトグラフィーを利用して精製することもできる〔山川彰夫、実験医学、13、469-474(1995)〕。例えば、ロウらの方法〔Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 86, 8227(1989)、Genes Develop., 4, 1288(1990)〕、特開平05-336963、W094/23201に記載の方法に準じて、本発明のポリペプチドまたは部分ペプチドをプロテインAとの融合タンパク質として生産し、イムノグロブリンGを用いるアフィニティークロマトグラフィーにより精製することができる。また、本発明のポリペプチドまたは部分ペプチドをFLAGペプチドとの融合タンパク質として生産し、抗FLAG抗体を用いるアフィニティークロマトグラフィーにより精製することができる〔Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 86, 8227(1989)、Genes Develop., 4, 1288(1990)〕。

【0113】更に、本発明のポリペプチドまたは部分ペプチド自身に対する抗体を用いたアフィニティークロマトグラフィーで精製することもできる。

【0114】また、公知の方法〔J. Biomolecular NMR, 6, 129, Science, 242, 1162(1988)、J. Biochem., 110, 166(1991)〕に準じて、*in vitro*転写・翻訳系を用いて本発明のポリペプチドまたは部分ペプチドを生産することもできる。

【0115】更に、本発明のポリペプチドまたは部分ペプチドは、Fmoc法(フルオレニルメチルオキシカルボニル法)、tBoc法(t-ブチルオキシカルボニル

法)等の化学合成法によっても製造することができる。また、Advanced ChemTech社、バーキン・エルマー社、ファルマシアバイオテック社、Protein Technology Instrument社、Synthecell-Vega社、PerSeptive社、島津製作所等のペプチド合成機を利用し化学合成することもできる。

【0116】精製した本発明のポリペプチドの構造解析は、蛋白質化学で通常用いられる方法、例えば遺伝子クローニングのためのタンパク質構造解析(平野久著、東京化学同人発行、1993年)に記載の方法により実施可能である。

【0117】上記の方法で得られる本発明のポリペプチドまたは部分ペプチドが遊離体で得られた場合には、公知の方法あるいはそれに準じる方法によって塩に変換することができ、逆に塩で得られた場合には公知の方法あるいはそれに準じる方法により、遊離体または他の塩に変換することができる。なお、本発明のポリペプチドまたは部分ペプチドを、適当な蛋白修飾酵素を作用させることにより、任意に修飾を加えたり、ポリペプチドを部分的に除去することもできる。蛋白修飾酵素としては、例えば、トリプシン、キモトリプシン、アルギニンエンドペプチダーゼ、プロテインキナーゼ、グリコシダーゼなどが用いられる。

【0118】上記方法で製造できる本発明のポリペプチドまたは部分ペプチド、若しくはそれらの塩の活性は、標識したリガンドとの結合実験および特異抗体を用いたエンザイムイムノアッセイなどにより測定することができる。

(5) 本発明のポリペプチドを認識する抗体

(5-1) 本発明のポリペプチドを認識する抗体の生産

(I) ポリクローナル抗体の作製

上記(4)に記載の方法により取得したポリペプチドまたは部分ペプチドを抗原として用い、動物に投与することによりポリクローナル抗体を作製することができる。

【0119】該抗原を投与する動物としては、ウサギ、ヤギ、3~20週令のラット、マウス、ハムスター等をあげることができる。該抗原の投与量は動物1匹当たり50~100 μ gが好ましい。抗原としてペプチドを用いる場合は、ペプチドをスカシガイヘモシアニン(keyhole limpet haemocyanin)や牛チログロブリンなどのキャリア蛋白に共有結合させたものを用いることができる。抗原とするペプチドは、ペプチド合成機によっても合成することができる。

【0120】該抗原の投与は、1回目の投与の後1~2週間おきに3~10回行う。各投与後、3~7日目に眼底静脈叢より採血し、該血清が免疫に用いた抗原と反応することを酵素免疫測定法(酵素免疫測定法(ELISA法):医学書院刊1976年、Antibodies-A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory (1988))等で確認する。

【0121】免疫に用いた抗原に対し、その血清が十分な抗体価を示した上記動物より血清を取得し、該血清を分離、精製することによりポリクローナル抗体を取得することができる。

【0122】分離、精製する方法としては、遠心分離、40~50%飽和硫酸アンモニウムによる塩析、カプリル酸沈殿〔Antibodies, A Laboratory manual, Cold Spring Harbor Laboratory, (1988)〕、またはDEAEセファロースカラム、陰イオン交換カラム、プロテインAまたはG-カラムあるいはゲル濾過カラム等を用いるクロマトグラフィー等を、単独または組み合わせて処理する方法があげられる。

(II) モノクローナル抗体の作製

(a) 抗体産生細胞の調製

免疫に用いた本発明のポリペプチドの部分ペプチドに対し、その血清が十分な抗体価を示した上記動物を抗体産生細胞の供給源として供することができる。

【0123】該抗体価を示した上記動物に抗原物質を最終投与した後3~7日目に、脾臓を摘出する。該脾臓をMEM培地(日水製薬社製)中で細断し、ピンセットでほぐし、1,200rpmで5分間遠心分離した後、上清を捨てる。得られた沈殿画分の脾細胞をトリス-塩化アンモニウム緩衝液(pH7.65)で1~2分間処理し赤血球を除去した後、MEM培地で3回洗浄し、得られた脾細胞を抗体産生細胞として用いる。

(b) 骨髓腫細胞の調製

骨髓腫細胞としては、マウスまたはラットから取得した株化細胞を使用する。

【0124】例えば、8-アザグアニン耐性マウス(BA/LB/c由来)骨髓腫細胞株P3-X63Ag8-U1(以下、P3-U1と略す)〔Curr. Topics. Microbiol. Immunol., 81, 1 (1978)、Europ. J. Immunol., 6, 511 (1976)〕、SP2/0-Ag14(SP-2)〔Nature, 276, 269 (1978)〕、P3-X63-Ag8653(653)〔J. Immunol., 123, 1548 (1979)〕、P3-X63-Ag8(X63)〔Nature, 256, 495 (1975)〕等を用いることができる。

【0125】これらの細胞株は、8-アザグアニン培地〔RPMI-1640培地にグルタミン(1.5mmol/L)、2-メルカプトエタノール(5 \times 10⁻⁵mmol/L)、ジェンタマイシン(10 μ g/ml)および牛胎児血清(FCS)(CSL社製、10%)を加えた培地(以下、正常培地という)に、さらに8-アザグアニン(15 μ g/ml)を加えた培地〕で継代するが、細胞融合の3~4日前に正常培地で培養し、融合には該細胞を2 \times 10⁷個以上用いる。

(c) ハイブリドーマの作製

(a)で取得した抗体産生細胞と(b)で取得した骨髓腫細胞をMEM培地またはPBS(リン酸二ナトリウム1.83g、リン酸一カリウム0.21g、食塩7.65g、蒸留水1リットル、pH7.2)でよく洗浄し、

細胞数が、抗体産生細胞：骨髓腫細胞＝5～10：1になるよう混合し、1,200rpmで5分間遠心分離した後、上清を捨てる。

【0126】得られた沈澱画分の細胞群をよくほぐし、該細胞群に、攪拌しながら、37℃で、10⁶抗体産生細胞あたり、ポリエチレングライコール-1000 (PEG-1000) 2g、MEM 2mlおよびジメチルスルホキシド (DMSO) 0.7mlを混合した溶液を0.2～1ml添加し、更に1～2分間毎にMEM培地1～2mlを数回添加する。添加後、MEM培地を加えて全量が50mlになるように調製する。

【0127】該調製液を900rpmで5分間遠心分離後、上清を捨てる。得られた沈澱画分の細胞を、ゆるやかにほぐした後、メスピペットによる吸込み、吹出してゆるやかにHAT培地〔正常培地にヒポキサンチン (10⁻⁴ mmol/L)、チミジン (1.5×10⁻⁵ mmol/L) およびアミノプテリン (4×10⁻⁷ M) を加えた培地〕100ml中に懸濁する。

【0128】該懸濁液を96穴培養用プレートに100μl/穴ずつ分注し、5% CO₂インキュベーター中、37℃で7～14日間培養する。培養後、培養上清の一部をとりアンチボディズ〔Antibodies, A Laboratory manual, Cold Spring Harbor Laboratory, Chapter 14 (1988)〕等に記載されている酵素免疫測定法により、本発明のポリペプチドの部分ペプチドに特異的に反応するハイブリドーマを選択する。

【0129】酵素免疫測定法の具体的例として、以下の方法をあげることができる

免疫の際、抗原に用いた本発明のポリペプチドの部分ペプチドを適当なプレートにコートし、ハイブリドーマ培養上清もしくは後述の(d)で得られる精製抗体を第一抗体として反応させ、さらに第二抗体としてビオチン、酵素、化学発光物質あるいは放射線化合物等で標識した抗ラットまたは抗マウスイムノグロブリン抗体を反応させた後に標識物質に応じた反応を行ない、本発明のポリペプチドに特異的に反応するものを本発明のポリペプチドに対するモノクローナル抗体を生産するハイブリドーマとして選択する。

【0130】該ハイブリドーマを用いて、限界希釈法によりクローニングを2回繰り返す〔1回目は、HT培地 (HAT培地からアミノプテリンを除いた培地)、2回目は、正常培地を使用する〕、安定して強い抗体価の認められたものを本発明のポリペプチドの抗ポリペプチド抗体産生ハイブリドーマ株として選択する。

(d)モノクローナル抗体の調製

プリスタン処理〔2, 6, 10, 14-テトラメチルペンタデカン (Pristane) 0.5mlを腹腔内投与し、2週間飼育する〕した8～10週令のマウスまたはヌードマウスに、(c)で取得した本発明のポリペプチドモノクローナル抗体産生ハイブリドーマ細胞5～20

×10⁶細胞/匹を腹腔内に注射する。10～21日間でハイブリドーマは腹水癌化する。

【0131】該腹水癌化したマウスから腹水を採取し、3,000rpmで5分間遠心分離して固形分を除去する。得られた上清より、ポリクローナルで用いた方法と同様の方法でモノクローナル抗体を精製、取得することができる。

【0132】抗体のサブクラスの決定は、マウスモノクローナル抗体タイピングキットまたはラットモノクローナル抗体タイピングキットを用いて行う。蛋白質量は、ローリー法あるいは280nmでの吸光度より算出する。

(5-2) 本発明の抗体の利用

(a) 本発明の抗体を用いる本発明のポリペプチドの免疫学的検出および定量本発明のポリペプチドの免疫学的検出法としては、マイクロタイタープレートを用いるELISA法、蛍光抗体法、ウェスタンブロット法、免疫組織染色法〔別冊 実験医学, ザ・プロトコールシリーズ, 免疫染色・in situハイブリダイゼーション, 羊土社 (1997)、Journal of Immunological Methods, 150, 5, (1992)〕等をあげることができる。

【0133】免疫学的定量法としては、液相中で本発明のポリペプチドと反応する抗体のうちエピトープが異なる2種類のモノクローナル抗体を用いたサンドイッチELISA法、¹²⁵I等の放射性同位体で標識した本発明のポリペプチドと本発明のポリペプチドを認識する抗体とを用いるラジオイムノアッセイ法等をあげることができる。

【0134】上記検出あるいは定量法は、大腸癌、胃癌等の診断に利用することができる。また、上記検出あるいは定量法を用いて本発明のポリペプチドを発現する細胞や細胞株を同定することができる。本発明のポリペプチドを発現する細胞や細胞株は、該ポリペプチドのリガンド、アゴニストまたはアンタゴニストの探索や該ポリペプチドの機能解析に有用である。

(b) 本発明の抗体を含有する医薬

本発明の抗体は、医薬、例えば視床または小脳の異常症、大腸癌、胃癌等の疾患の治療薬として用いることができる。

【0135】本発明の抗体を含有する医薬は、治療薬として該化合物単独で投与することも可能ではあるが、通常は薬理学的に許容される一つあるいはそれ以上の担体と一緒に混合し、製剤学の技術分野においてよく知られる任意の方法により製造した医薬製剤として提供するのが望ましい。

【0136】投与経路は、治療に際して最も効果的なものを使用するのが望ましく、経口投与、または口腔内、気道内、直腸内、皮下、筋肉内および静脈内等の非経口投与をあげることができる。投与形態としては、噴霧剤、カプセル剤、錠剤、顆粒剤、シロップ剤、乳剤、座

剤、注射剤、軟膏、テープ剤等があげられる。

【0137】経口投与に適切な製剤としては、乳剤、シロップ剤、カプセル剤、錠剤、散剤、顆粒剤等があげられる。例えば乳剤およびシロップ剤のような液体調製物は、水、ショ糖、ソルビトール、果糖等の糖類、ポリエチレングリコール、プロピレングリコール等のグリコール類、ごま油、オリーブ油、大豆油等の油類、p-ヒドロキシ安息香酸エステル類等の防腐剤、ストロベリーフレーバー、ペパーミント等のフレーバー類等を添加剤として用いて製造できる。カプセル剤、錠剤、散剤、顆粒剤等は、乳糖、ブドウ糖、ショ糖、マンニトール等の賦形剤、デンプン、アルギン酸ナトリウム等の崩壊剤、ステアリン酸マグネシウム、タルク等の滑沢剤、ポリビニルアルコール、ヒドロキシプロピルセルロース、ゼラチン等の結合剤、脂肪酸エステル等の界面活性剤、グリセリン等の可塑剤等を添加剤として用いて製造できる。

【0138】非経口投与に適切な製剤としては、注射剤、座剤、噴霧剤等があげられる。例えば、注射剤は、塩溶液、ブドウ糖溶液、あるいは両者の混合物からなる担体等を用いて調製する。座剤はカカオ脂、水素化脂肪またはカルボン酸等の担体を用いて調製される。また、噴霧剤は該化合物そのもの、ないしは受容者の口腔および気道粘膜を刺激せず、かつ該化合物を微細な粒子として分散させ吸収を容易にさせる担体等を用いて調製する。担体として具体的には乳糖、グリセリン等が例示される。該化合物および用いる担体の性質により、エアロゾル、ドライパウダー等の製剤が可能である。また、これらの非経口剤においても経口剤に添加剤として例示した成分を添加することもできる。

【0139】投与量または投与回数は、目的とする治療効果、投与方法、治療期間、年齢、体重等により異なるが、通常成人1日当たり $10\mu\text{g}/\text{kg}\sim 8\text{mg}/\text{kg}$ である。

(6) 本発明のポリペプチドまたは本発明の部分ペプチドの利用

(6-1) 本発明のG蛋白質共役型受容体ポリペプチドに対するリガンドのスクリーニング方法

本発明のポリペプチドまたは本発明の部分ペプチドを用いて、本発明のポリペプチドに対するリガンドを探索、決定できる。

【0140】該リガンドを探索または決定する方法としては、例えば本発明のポリペプチドまたは部分ペプチドもしくはそれらの塩と、試験物質とを接触させ、試験物質より本発明のポリペプチドに対するリガンドを選択する方法、または本発明のポリペプチドまたは部分ペプチドを発現する細胞や該細胞の膜画分と、試験物質とを接触させ、試験物質より本発明のポリペプチドに対するリガンドを選択する方法等をあげることができる。

【0141】試験物質としては、公知のリガンド〔例えば、アンギオテンシン、ボンベシン、カナビノイド、コ

レシストキニン、グルタミン、セロトニン、メラトニン、ニューロペプチドY、オピオイド、ブリン、バソプレッシン、オキシトシン、PACAP (ピチュイタリ アデニレートシクラーゼ アクティブエーティング プロテイン)、セクレチン、グルカゴン、カルシトニン、アドレノメジュリン、ソマトスタチン、GHRH (グロースホルモン リリースング ホルモン)、CRF (コルチコトロピン リリースング ファクター)、ACTH (アドレノコルチコトロピック ホルモン)、メラニンスティミュレーションホルモン、GRP (ガストリン リリースング ペプチド)、PTH (パラチロイド ホルモン)、VIP (バソアクティブ インテスティナル アンチリレイテッド ポリペプチド)、ドーパミン、モチリン、アミリン、ブラジキニン、CGRP (カルシトニンジーンリレイテッド ペプチド)、ロイコトリエン、バンクレアスタチン、プロスタグランジン、トロンボキササン、アデノシン、アドレナリン、 α および β -ケモカイン〔例えば、IL-8 (インターロイキン-8)、GRO α (グロース リレイテッド ジーン α)、GRO β 、GRO γ 、NAP-2 (ニューロナル カルモジュリン バインディング プロテイン-2)、ENA-78 (エビセリアルセル-デライド ニュートロフィル-アクティブエーティング プロテイン-78)、PF4 (プレートレット ファクター-4)、IP10 (インターフェロン γ インデュシブル プロテイン オブ 10kd)、GCP-2 (グラニューロサイト ケモタクティック プロテイン-2)、MCP-1 (モノサイト ケモアトラクタント プロテイン-1)、HC14、MCP-3、I-309、MIP1 α (マクロファージ インフラマトリ プロテイン1 α)、MIP-1 β 、RANTES (レギュレーテッド オン アクチベーション、ノーマル Tセル エクスプレッドアンド セクレテッド) など〕、エンドセリン、エンテログアストリン、ヒスタミン、ニューロテンシン、TRH、バンクレアティックポリペプチド、ガラニン、ウロテンシンIおよびII、ニューロペプチドFF、オレキシンおよびメラニン コンセントレーティングホルモンなど〕の他に、例えば、ヒトまたは哺乳動物 (例えば、マウス、ラット、ブタ、ウシ、ヒツジ、サルなど) の組織抽出物や該抽出物由来の精製物、細胞培養上清や該上清由来の精製物などの生体試料や、既知蛋白質、組換え技術を用いて生産された組換え蛋白質、微生物の菌体抽出液や該抽出液由来の精製物、微生物培養上清や該上清由来の精製物、既知化合物、コンビナトリアルケミストリーを用いて合成された化合物などがあげられる。

【0142】具体的な本発明のポリペプチドに対するリガンドの探索または決定方法としては、本発明のポリペプチドまたは部分ペプチド、若しくはその塩、あるいは本発明のポリペプチドまたは部分ペプチドを発現する細胞に対して試験物質を作用させ、本発明のポリペプチド

または部分ペプチド、若しくはその塩に対する試験物質の結合量を測定する、あるいは本発明のポリペプチドを発現する細胞の応答を検出する方法をあげることができる。

【0143】より具体的には、(a) 標識した試験物質を、本発明のポリペプチドまたは部分ペプチドもしくはそれらの塩に接触させた場合における、標識した試験物質の該ポリペプチドまたは部分ペプチド若しくはそれらの塩に対する結合量を測定し、該試験物質から本発明のポリペプチドまたはその塩に対するリガンドを選択することを特徴とする、本発明のポリペプチドに対するリガンドの決定方法、(b) 標識した試験物質を、本発明のポリペプチドまたは部分ペプチドを含有する細胞または該細胞の膜画分に接触させた場合における、標識した試験物質の該細胞または該膜画分に対する結合量を測定し、該試験物質から本発明のポリペプチドに対するリガンドを選択することを特徴とする、本発明のポリペプチドに対するリガンドの決定方法、(c) 試験物質を、本発明のポリペプチドを含有する細胞または該細胞の膜画分に接触させた場合における、標識したGTPγSのGα蛋白質への結合量を測定し、試験物質から本発明のポリペプチドに対するリガンドを選択することを特徴とする、本発明のポリペプチドに対するリガンドの決定方法、(d) 試験物質を、本発明のポリペプチドを含有する細胞または該細胞の膜画分に接触させた場合におけるGTPase活性を測定し、試験物質より本発明のペプチドに対するリガンドを選択することを特徴とする、本発明のポリペプチドに対するリガンドの決定方法、

(e) 試験物質を、本発明のポリペプチドを含有する細胞に接触させた場合における、ポリペプチドを介した細胞刺激活性(例えば、アラキドン酸遊離、アセチルコリン遊離、細胞内Ca²⁺遊離、細胞内cAMP生成、細胞内cGMP生成、イノシトールリン酸産生、細胞膜電位変動、細胞内蛋白質のリン酸化、c-fos活性化、pHの低下、細胞増殖活性、メラニン色素の凝集または拡散、またはレポーター遺伝子の発現量などを促進する活性または抑制する活性など)を測定し、試験物質より本発明のポリペプチドに対するリガンドを選択することを特徴とする、本発明のポリペプチドに対するリガンドの決定方法、をあげることができる。

【0144】以下に、本発明のリガンドを探索、または決定する方法をより詳細に説明する。

(I) 試験物質の結合量を測定する方法

上記(a)および(b)に示したように、本発明のポリペプチドまたは部分ペプチド若しくはその塩、あるいは本発明のポリペプチドまたは部分ペプチドを発現する細胞に対して標識した試験物質を作用させ、本発明のポリペプチドに対する試験物質の結合量を測定し、試験物質より本発明のポリペプチドに対するリガンドを選択することにより、本発明のポリペプチドに対するリガンドを探索

または決定することができる。

【0145】試験物質としては、例えば、³H、¹⁴C、¹²⁵I、³⁵S、³²P等の放射性同位元素で標識した公知のGPCRのリガンド〔アンギオテンシン、ボンベシン、カナビノイド、コレシストキニン、グルタミン、セロトニン、メラトニン、ニューロペプチドY、オピオイド、プリン、バソプレッシン、オキシトシン、PACAP、セクレチン、グルカゴン、カルシトニン、アドレノメジュリン、ソマトスタチン、GHRH、CRF、ACTH、メラニンスティミュレーションホルモン、GRP、PTH、VIP、ドーパミン、モチリン、アミリン、ブラジキニン、CGRP、ロイコトリエン、パンクレアスタチン、プロスタグランジン、トロンボキサン、アデノシン、アドレナリン、αおよびβ-ケモカイン(例えば、IL-8、GROα、GROβ、GROγ、NAP-2、ENA-78、PF4、IP10、GCP-2、MCP-1、HC14、MCP-3、I-309、MIP1α、MIP-1β、RANTESなど)、エンドセリン、エンテログastrin、ヒスタミン、ニューロテンシン、TRH、パンクレアティックポリペプチド、ガラニン、ウロテンシンIおよびII、ニューロペプチドFF、オレキシンおよびメラニンコンセンサレーティングホルモンなど〕を用いることができる。また、³H、¹⁴C、¹²⁵I、³⁵S、³²P等の放射性同位元素で標識した任意の蛋白質、ペプチドまたは化合物を用いることもできる。

【0146】上記方法において、本発明のポリペプチドまたは部分ペプチドとして、該ポリペプチドまたは部分ペプチドを直接用いることもできるが、該ポリペプチドまたは部分ペプチドを含有する細胞そのもの、またはその細胞膜画分を用いることもできる。細胞膜画分を用いる際の部分ペプチドとしては、リガンド結合能を有する親水性部位と細胞膜貫通領域である疎水性部位の両方を有する部分ペプチドが好ましい。該ポリペプチドまたは部分ペプチドを含有する細胞を用いる場合、該細胞をグルタルアルデヒド、ホルマリンなどで固定化してもよい。

【0147】また、本発明のポリペプチドまたは部分ペプチドとして、天然に存在するポリペプチドまたは部分ペプチド、あるいは遺伝子組換えの手法を用いて作製した組換えポリペプチドまたは組換え部分ペプチドのいずれも用いることができる。本発明のポリペプチドとして、(3)に記載の方法により、配列番号2で表される塩基配列を有するDNAに変異を導入して得られる変異DNAにコードされるポリペプチドのうち、構成的に活性型となった変異型ポリペプチドは特に有用である。

【0148】G蛋白質共役型受容体(GPCR)の中には、GPCRポリペプチドを細胞に過剰に発現させた際に、リガンドが存在しなくてもシグナルを流すものが存在し、これらは構成活性型GPCRと呼ばれる。また、

ももとは構成活性型ではないGPCRにおいても、アミノ酸の置換、欠失などの変異を導入することにより構成活性型になることが知られている。構成活性型に変化した変異GPCRでは、アゴニストとの親和性が増加する場合があることが知られていることから、構成活性型の変異GPCRはリガンドの探索において有用と考えられる〔Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics, 275, 1274 (1995)、Endocrinology, 137, 3936 (1996)、J. Biol. Chem., 272, 1822 (1997)〕。

【0149】該構成活性型GPCRは既知の方法に従って取得することができる〔J. Biol. Chem., 271, 1857 (1996)、Science, 268, 98 (1995)、Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics, 275, 1274 (1995)、J. Biol. Chem., 272, 1822 (1997)、Journal of Receptor and Signal Transduction Research, 17, 57 (1997)、WO98/46995〕。

【0150】上記の細胞膜画分とは、細胞を破碎した後、それ自体公知の方法で得られる細胞膜が多く含まれる画分のことをいう。細胞の破碎方法としては、Potter-Elvehjem型ホモジナイザーで細胞を押し潰す方法、ワーリングブレンダーやポリトロン (Kinematica社製) による破碎、超音波による破碎、フレンチプレスなどで加圧しながら細胞を細いノズルから噴出させることによる破碎などが挙げられる。細胞膜の分画には、分画遠心分離法や密度勾配遠心分離法などの遠心力による分画法が主として用いられる。例えば、細胞破碎液を低速 (500~3000rpm) で短時間 (通常、約1~10分間) 遠心分離し、上清をさらに高速 (15000~30000rpm) で通常30分~2時間遠心分離し、得られる沈澱を膜画分とする。該膜画分中には、発現した受容体蛋白質と細胞由来のリン脂質や膜蛋白質などの膜成分が多く含まれる。

【0151】本発明のポリペプチドを発現する細胞としては、上記(4)に記載したように、該ポリペプチドをコードするDNAを含む組換え体DNAを適当な宿主細胞に導入して得られる形質転換細胞のように大量に該ポリペプチドを発現している細胞を用いることもできる。大腸菌、枯草菌、酵母などの微生物の他、昆虫細胞、カエルの卵母細胞、カエルのメラニン細胞、動物細胞、植物細胞などがあげられるが、該形質転換体が生産する本発明のポリペプチドが高次構造を保ち、リガンドとの結合性を保持するためには、酵母、昆虫細胞、カエルの卵母細胞、カエルのメラニン細胞、動物細胞、植物細胞などで発現させるのが好ましい。

【0152】本発明のポリペプチドまたは部分ペプチドを含有する細胞やその細胞膜画分中のポリペプチドまたは部分ペプチドの量は、例えば1細胞当たり $10^3 \sim 10^8$ 分子であるのが好ましく、 $10^5 \sim 10^7$ 分子であるのが好適である。なお、発現量が多いほど膜画分当たりのリガンド結合活性 (比活性) が高くなり、高感度なスクリーニン

グ系の構築が可能になるばかりでなく、同一ロットで大量の試料を測定できるようになる。

【0153】以下、具体例を示す。

【0154】本発明のポリペプチドまたは部分ペプチドを含有する細胞または該細胞の細胞膜画分を、適当なバッファーに懸濁することにより本発明のポリペプチドの標品を調製する。バッファーは、リガンドと本発明のポリペプチドとの結合を阻害しないバッファーであればいずれでもよく、例えばpH4~10 (望ましくはpH6~8) のリン酸バッファーやTris-HClバッファーなどが用いられる。また、非特異的結合を低減させる目的で、CHAPS、Tween-80、ジギトニン、デオキシコール酸などの界面活性剤やウシ血清アルブミンやゼラチンなどの各種蛋白質をバッファーに加えることもできる。さらに、プロテアーゼによる本発明のポリペプチドやリガンドの分解を抑える目的でPMSF、ロイペプチン、E-64、ペプスタチンなどのプロテアーゼ阻害剤を添加することもできる。10 μ l~10mlの該ポリペプチド標品に、放射性同位元素 (3 H、 125 I、 14 C、 35 S、 32 Pなど) で標識した一定の放射能量の試験物質を共存させる。非特異的結合量 (NSB) を知るために大過剰の未標識の試験物質を加えた反応チューブも用意する。反応は約0~50 $^{\circ}$ C、望ましくは約4~37 $^{\circ}$ Cで、約20分~24時間、望ましくは約30分~3時間行なう。反応後、ガラス繊維濾紙等で濾過し、適量の同バッファーで洗浄した後、ガラス繊維濾紙に残存する放射活性を液体シンチレーションカウンターあるいは γ -カウンターで計測する。全結合量 (B) から非特異的結合量 (NSB) を引いたカウント (B-NSB) が0cpmを越える試験物質を本発明のポリペプチドに結合する物質として選択することができる。これらの内、本発明のポリペプチドを含有する細胞または該細胞の細胞膜画分への結合活性が強く、かつ本発明のポリペプチドを含有しない細胞または該細胞の細胞膜画分への結合活性が弱い物質を、本発明のポリペプチドのリガンドとして選択することができる。

【0155】上記方法において、本発明のポリペプチドまたは部分ペプチドを含有する細胞として、本発明のポリペプチドを発現しない宿主細胞に該ポリペプチドまたは該部分ペプチドをコードするDNAをベクターDNAに組み込んだ組換え体DNAを導入して得られる該ポリペプチドまたは該部分ペプチド発現細胞を用い、本発明のポリペプチドを含有しない細胞として、同宿主細胞にベクターのみを導入することによって作製した該ポリペプチドを発現しないコントロール細胞を用いることにより、リガンドの判定をより正確に行うことができる。

(II) GTP γ SのG α 蛋白質への結合量を測定する方法

上記(c)に示したように、本発明のポリペプチドを含有する細胞または細胞の膜画分に試験物質を接触させ、

標識したGTP γ SのG α 蛋白質(膜画分)への結合量を測定することにより、該ポリペプチドのリガンドを探索または決定することができる[Molecular Pharmacology, 47, 848 (1995)、WO98/46995]。

【0156】試験物質としてはいかなる物質も使用できるが、例えば、既知ペプチド、既知GPCRリガンド、既知蛋白質、組換え技術を用いて生産された組換え蛋白質、細胞抽出液や該抽出液由来の精製物、細胞培養上清や該上清由来の精製物、血清などの生体試料や該生体試料由来の精製物、微生物の菌体抽出液や該抽出液由来の精製物、微生物培養上清や該上清由来の精製物、既知化合物、コンビナトリアルケミストリーを用いて合成された化合物などを使用することができる。標識したGTP γ Sとしては、例えば³⁵Sで標識したGTP γ Sを用いることができる。

【0157】本発明のポリペプチドを含有する細胞または該細胞の膜画分としては、上記(I)に記載したものを使用することができる。

【0158】以下、具体例を示す。

【0159】本発明のポリペプチドを含有する細胞または細胞膜画分標品を、上記(I)に記載した方法により調製する。10 μ l~10mlの該ポリペプチド標品に、試験化合物、放射性同位元素(³⁵Sなど)で標識した一定の放射能量のGTP γ S、およびGDPを共存させる。非特異的結合量(NSB)を知る必要がある場合は、大過剰の未標識のGTP γ Sを加えた反応チューブを用意する。全結合量(B)から非特異的結合量(NSB)を引いたカウント(B-NSB)が特異的結合量である。反応は約0~50℃、望ましくは約4~37℃で、約20分~24時間、望ましくは約30分~3時間行なう。反応後、ガラス繊維濾紙等で濾過し、適量の同バッファーで洗浄した後、ガラス繊維濾紙に残存する放射活性を液体シンチレーションカウンターで計測する。同様の操作を本発明のポリペプチドを発現しない細胞または細胞膜画分を用いて行い、放射活性を測定する。

【0160】本発明のポリペプチドを含有する細胞または該細胞の膜画分を用いた際のGTP γ Sの細胞または該細胞の膜画分への結合活性と、本発明のポリペプチドを発現していない細胞または該細胞の膜画分を用いた際の、GTP γ Sの細胞または細胞膜画分への結合活性を比較し、試験試料より、本発明のポリペプチドを含有する細胞または該細胞の膜画分を用いた際にGTP γ Sの膜画分への結合を増強する活性が強い物質を、本発明のポリペプチドのリガンドとして選択することができる。

【0161】上記方法において、本発明のポリペプチドを含有する細胞として、本発明のポリペプチドを発現しない宿主細胞に該ポリペプチドをコードするDNAをベクターに組み込んだ組換え体DNAを導入して得られる、本発明のポリペプチドを発現する細胞を用い、本発明のポリペプチドを含有しない細胞として、同宿主細胞

にベクターのみを導入することによって作製した、本発明のポリペプチドを発現しないコントロール細胞を用いることにより、リガンドの判定をより正確に行うことができる。

(III) GTPase活性を測定する方法

上記(d)に示したように、本発明のポリペプチドを含有する細胞または細胞の膜画分に試験物質を接触させ、GTPase活性を測定することにより、本発明のポリペプチドのリガンドを探索または決定することができる[J. Biol. Chem., 271, 1857 (1996)、J. Biol. Chem., 271, 1857 (1996)、WO98/46995]。

【0162】試験物質としては、上記(II)に記載した物質を使用することができる。

【0163】本発明のポリペプチドを含有する細胞または該細胞の膜画分としては、上記(I)に記載したものを使用することができる。

【0164】以下、具体例を示す。

【0165】本発明のポリペプチドを含有する細胞または細胞膜画分標品を、上記(I)に記載した方法により調製する。10 μ l~10mlの該ポリペプチド標品に、試験化合物、放射性同位元素(³²Pなど)で標識した一定の放射能量のGTP(例えば[γ -³²P]GTP)を共存させる。反応は約0~50℃、望ましくは約4~37℃で、約20分~24時間、望ましくは約30分~3時間行なう。反応後、反応液の上清を回収し、遊離した[γ -³²P]Piの放射活性を液体シンチレーションカウンターで計測する。反応液をガラス繊維濾紙等で濾過し、適量の同バッファーで洗浄した後、濾過液中の放射活性を液体シンチレーションカウンターで計測してもよい。同様に、本発明のポリペプチドを含有しない細胞または細胞膜画分についても、濾過液中の放射活性を測定する。

【0166】本発明のポリペプチドを含有する細胞または該細胞の膜画分を用いた際のGTPase活性と、本発明のポリペプチドを発現していない細胞または該細胞の膜画分を用いた際のGTPase活性を比較し、試験化合物中より、本発明のポリペプチドを含有する細胞または該細胞の膜画分を用いた際にGTPase活性を増強する活性が強い化合物を本発明のポリペプチドのリガンドとして選択することができる。

【0167】上記方法において、本発明のポリペプチドを含有する細胞として、本発明のポリペプチドを発現しない宿主細胞に該ポリペプチドをコードするDNAをベクターに組み込んだ組換え体DNAを導入して得られる、本発明のポリペプチドを発現する細胞を用い、本発明のポリペプチドを含有しない細胞として、同宿主細胞にベクターのみを導入することによって作製した、本発明のポリペプチドを発現しないコントロール細胞を用いることにより、リガンドの判定をより正確に行うことができる。

(IV) 細胞の応答を検出する方法

上記(e)に示したように、本発明のポリペプチドを発現する細胞に試験物質を接触させ、該ポリペプチドの活性化を細胞の応答を指標として検出することにより、該ポリペプチドのリガンドを探索または決定することができる。細胞の応答としては、例えば、アラキドン酸遊離、アセチルコリン遊離、細胞内 Ca^{2+} 遊離、細胞内cAMP生成、細胞内cAMP減少、細胞内cGMP生成、イノシトールリン酸産生、細胞膜電位変動、細胞内蛋白質のリン酸化、c-fos活性化、pHの低下、細胞増殖活性、メラニン色素の凝集または拡散、またはレ

ポーター遺伝子の発現量などをあげることができる〔J. Biol. Chem., 271, 1857 (1996)、Science, 268, 98 (1995)、Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics, 275, 1274 (1995)、J. Biol. Chem., 272, 1822 (1997)、Journal of Receptor and Signal Transduction Research, 17, 57 (1997)、Endocrinology 138, 1400 (1997)、Endocrinology 138, 1471 (1997)、Nat. Biotechnol., 16, 1334 (1998)、Biochem. Biophys. Res. Commun., 251, 471 (1998)、Brit. J. Pharmacol., 125, 1387 (1998)、Trends Biotechnol., 15, 487 (1997)、Anal. Biochem., 252, 115 (1997)、Nature, 358, 325 (1992)、Nature, 393, 272 (1998)、Cell, 92, 573 (1998)、J. Biol. Chem., 272, 27497 (1997)、Trends Pharmacol. Sci., 18, 430 (1997)、Trends Pharmacol. Sci., 20, 370 (1999)、W098/46995〕。

【0168】レポーター系を用いて細胞の応答をモニターする場合は、例えば、本発明のポリペプチドを発現する細胞に、該ポリペプチドの活性化により発現が誘導される遺伝子のプロモーター配列の下流に適当なレポーター遺伝子を連結したDNAを導入することにより、該ポリペプチドの活性化をレポーター遺伝子の発現で測定することができる。該プロモーターとしては、例えばICAM-1遺伝子のプロモーター、c-fosのプロモーター、Krox-24のプロモーター〔Biochem. J., 320, 145 (1996)〕などが利用できる。また、該プロモーターは、適当な転写因子の結合配列と基本プロモーターからなる人工プロモーターでもよい。転写因子の結合配列としては、例えばCRE (CREB binding element)、TRE (TPA responsive element)、SRE (serum responsive element) などが利用できる。レポーター遺伝子としては、クロラムフェニコール・アセチルトランスフェラーゼ遺伝子、 β -ガラクトシダーゼ遺伝子、 β -ガラクトシダーゼ遺伝子、 β -ラクタマーゼ遺伝子、エクオリン遺伝子、ルシフェラーゼ遺伝子およびグリーン・フルオレッセント・プロテイン遺伝子などが利用できる。

【0169】上記方法で用いられる本発明のポリペプチドを含有する細胞としては、上記(I)に記載したものを使用することができる。

【0170】本発明のポリペプチドを発現する細胞とし

ては、上記(4)に記載したように、該ポリペプチドをコードするDNAを含む組換え体DNAを適当な宿主細胞に導入して得られる形質転換細胞のように大量に該ポリペプチドを発現している細胞を用いることもできる。宿主細胞としては、大腸菌、枯草菌、酵母などの微生物の他、昆虫細胞、カエルの卵母細胞、カエルのメラニン細胞、動物細胞、植物細胞などを用いることができるが、該形質転換細胞が発現する該ポリペプチドが高次構造を保ち、リガンドとの結合性や機能性を保持するためには、酵母、昆虫細胞、カエルの卵母細胞、カエルのメラニン細胞、動物細胞、植物細胞などで発現させるのが好ましい。また酵母の変異株や改変G α 蛋白質を発現させた酵母などを宿主として利用することもできる〔Trends in Biotechnology, 15, 487 (1997)、Mol. Cell. Biol., 15, 6188 (1995)、Mol. Cell. Biol., 16, 4700 (1996)〕。

【0171】試験物質としては、上記(II)に記載した物質を使用することができる。

【0172】以下具体例を示す。

【0173】本発明のポリペプチドを発現する細胞をマルチウェルプレート等に培養する。培養後、必要に応じて新鮮な培地あるいは細胞に毒性を示さない適当なバッファーに交換し、試験化合物を添加して一定時間インキュベートする。その後、細胞の応答(例えば、アラキドン酸遊離、アセチルコリン遊離、細胞内 Ca^{2+} 遊離、細胞内cAMP生成、細胞内cGMP生成、イノシトールリン酸産生、細胞膜電位変動、細胞内蛋白質のリン酸化、c-fos活性化、pHの低下、細胞増殖活性、メラニン色素の凝集または拡散、またはレポーター遺伝子の発現量などを促進する活性または抑制する活性など)を測定する。例えば、上記細胞の抽出液や上清を用いて、該細胞の応答により生成した産物を常法に従って定量する。細胞刺激活性の指標とする物質(例えば、アラキドン酸など)の生成が、細胞が含有する分解酵素によって検定困難な場合は、該分解酵素に対する阻害剤を添加して定量してもよい。また、cAMP産生抑制などの活性については、フォルスコリンなどで細胞のcAMP産生量を増大させておいた細胞に対する産生抑制作用として検出することができる。

【0174】同様の操作を、本発明のペプチドを発現しない細胞についても行い、上記の細胞の応答を測定する。

【0175】本発明のポリペプチドを含有する細胞を用いた際の細胞の応答と、本発明のポリペプチドを発現していない細胞を用いた際の細胞の応答を比較し、試験物質より、本発明のポリペプチドを含有する細胞を用いた際に細胞の応答が強く検出される物質を、本発明のポリペプチドのリガンドとして選択することができる。

【0176】上記方法において、本発明のポリペプチドを含有する細胞として、本発明のポリペプチドを発現し

ない宿主細胞に該ポリペプチドをコードするDNAをベクターに組み込んだ組換え体DNAを導入して得られる、本発明のポリペプチドを発現する細胞を用い、本発明のポリペプチドを含有しない細胞として、同宿主細胞にベクターのみを導入することによって作製した、本発明のポリペプチドを発現しないコントロール細胞を用いることにより、リガンドの判定をより正確に行うことができる。

(6-2) 本発明のG蛋白質共役型受容体ポリペプチドに対するリガンドのスクリーニング用キット

本発明のポリペプチドまたはその塩に結合するリガンドのスクリーニング用キットは、本発明のポリペプチドまたは本発明の部分ペプチドもしくはそれらの塩、本発明のポリペプチドまたは本発明の部分ペプチドを含有する細胞、または該細胞の膜画分などを含有する。本発明のリガンドのスクリーニング用キットの例としては、次のものがあげられる。

(a) リガンドスクリーニング用試薬

①測定用緩衝液および洗浄用緩衝液

Hanks' Balanced Salt Solution (ギブコ社製) に、0.05%のウシ血清アルブミン (シグマ社製) を加えたもの。孔径0.45 μ mのフィルターで濾過滅菌し、4 $^{\circ}$ Cで保存するか、あるいは用時調製しても良い。

②本発明のポリペプチドまたは部分ペプチド標品

本発明のポリペプチドまたは部分ペプチドを発現させたCHO細胞を、12穴プレートに5 \times 10⁵個/穴で継代し、5%CO₂、95%air インキュベーター中、37 $^{\circ}$ Cで2日間培養したもの。

③標識試験化合物

市販の [³H]、[¹²⁵I]、[¹⁴C]、[³⁵S] などて標識した化合物、または適当な方法で標識化した化合物。該化合物の水溶液状態のものを4 $^{\circ}$ Cあるいは-20 $^{\circ}$ Cにて保存し、用時に測定用緩衝液にて1 μ mol/Lに希釈する。水に難溶性を示す試験化合物については、ジメチルホルムアミド、DMSO、メタノール等に溶解する。

④非標識試験化合物

標識化合物の100~1000倍濃度に調製した非標識化合物。

(b) 測定法

①12穴組織培養用プレートを用いて培養した本発明のポリペプチドを発現するCHO細胞を、測定用緩衝液1mlで2回洗浄した後、490 μ lの測定用緩衝液を各穴に加える。

②標識試験化合物を5 μ l加え、室温で1時間反応させる。非特異的結合量を知るために非標識試験化合物を5 μ l加えておいたものを準備してもよい。

③反応液を除去し、1mlの洗浄用緩衝液で3回洗浄する。細胞に結合した標識試験化合物を溶解液(0.2mol/L NaOH、1%SDS)で溶解し、4mlの

液体シンチレーターA (和光純薬製) と混合する。

④液体シンチレーションカウンター (ベックマン社製) を用いて放射活性を測定する。

【0177】本発明のポリペプチドのリガンドとしては、例えば、脳、視床下部、下垂体、脾臓などに存在する物質などが挙げられるが、本発明のリガンドには、既知のリガンドは含まれない。既知のリガンドとしては、アンギオテンシン、ボンベシン、カナビノイド、コレシストキニン、グルタミン、セロトニン、メラトニン、ニューロペプチドY、オピオイド、プリン、バソプレッシン、オキシトシン、PACAP、セクレチン、グルカゴン、カルシトニン、アドレノメジュリン、ソマトスタチン、GHRH、CRF、ACTH、メラニンステイミュレーションホルモン、GRP、PTH、VIP、ドーパミン、モチリン、アミリン、ブラジキニン、CGRP、ロイコトリエン、パンクレアスタチン、プロスタグランジン、トロンボキサン、アデノシン、アドレナリン、 α および β -ケモカイン (例えば、IL-8、GRO α 、GRO β 、GRO γ 、NAP-2、ENA-78、PF4、IP10、GCP-2、MCP-1、HC14、MCP-3、I-309、MIP1 α 、MIP-1 β 、RANTESなど)、エンドセリン、エンテログストリン、ヒスタミン、ニューロテンシン、TRH、パンクレアティックポリペプチド、ガラニン、ウロテンシンIおよびII、ニューロペプチドFF、オレキシンおよびメラニンコンセンソレーティングホルモンなどがあげられる。

(6-3) 本発明のG蛋白質共役型受容体ポリペプチドに対するリガンドの定量法

本発明のポリペプチドまたはその部分ペプチドもしくはそれらの塩は、リガンドに対して結合性を有しているので、生体内におけるリガンド濃度を感度良く定量することができる。本発明の定量法は、例えば、競合法と組み合わせることによって用いることができる。すなわち、被検体を本発明のポリペプチドまたはその部分ペプチドもしくはそれらの塩と接触させることによって、被検体中のリガンド濃度を測定することができる。具体的には、例えば、既知の方法〔入江寛編「ラジオイムノアッセイ」(講談社、昭和49年発行)、入江寛編「続ラジオイムノアッセイ」(講談社、昭和54年発行)〕あるいはそれに準じる方法に従って行うことができる。

(6-4) 本発明のG蛋白質共役型受容体ポリペプチドのアゴニスト、アンタゴニストまたは機能修飾物質のスクリーニング方法

本発明のポリペプチドまたはその部分ペプチドもしくはそれらの塩、あるいは本発明のポリペプチドまたは部分ペプチドを発現する細胞や該細胞の膜画分は、本発明のポリペプチドに対するアゴニスト、アンタゴニストまたは機能修飾物質を選択するための試薬として有用である。

【0178】本発明のポリペプチドのアゴニスト、アンタゴニストまたは機能修飾物質のスクリーニング方法としては、例えば、(A) ①本発明のポリペプチドまたはその部分ペプチドもしくはそれらの塩と、リガンドとを接触させた場合と、②本発明のポリペプチドまたはその部分ペプチドもしくはそれらの塩と、リガンドおよび試験物質とを接触させた場合との比較を行ない、試験物質より本発明のポリペプチドのアゴニスト、アンタゴニストまたは機能修飾物質を選択することを特徴とする方法、(B) ①本発明のポリペプチドまたはその部分ペプチドを発現する細胞または該細胞膜画分と、リガンドとを接触させた場合と、②本発明のポリペプチドまたはその部分ペプチドを発現する細胞または該細胞膜画分と、リガンドおよび試験物質とを接触させた場合との比較を行ない、試験物質より本発明のポリペプチドのアゴニスト、アンタゴニストまたは機能修飾物質を選択することを特徴とする方法、(C) 上記(6-1)の(a)~(d)に記載した本発明のポリペプチドのリガンドの探索法と同じ方法を用いることを特徴とする方法、をあげることができる。

【0179】また、上記(6-1)の(a)~(d)に記載した本発明のポリペプチドのリガンドの探索法においては(6-1)に記載した構成活性型の変異ポリペプチドを用いることを特徴とする、本発明のポリペプチドのアゴニスト、アンタゴニストまたは機能修飾物質のスクリーニング方法もあげることができる。

【0180】より具体的には、(a) ①標識したリガンドを、本発明のポリペプチドまたは部分ペプチドもしくはそれらの塩に接触させた場合と、②標識したリガンドおよび試験物質を本発明のポリペプチドまたはその部分ペプチドもしくはそれらの塩に接触させた場合における、標識したリガンドの該ポリペプチドまたはその部分ペプチドもしくはそれらの塩に対する結合量を測定して比較し、標識したリガンドより本発明のポリペプチドのアゴニスト、アンタゴニストまたは機能修飾物質を選択することを特徴とする、本発明のポリペプチドのアゴニスト、アンタゴニストまたは機能修飾物質のスクリーニング方法、(b) ①標識したリガンドを、本発明のポリペプチドまたは部分ペプチドを含有する細胞または該細胞の膜画分に接触させた場合と、②標識したリガンドおよび試験物質を本発明のポリペプチドまたは部分ペプチドを含有する細胞または該細胞の膜画分に接触させた場合における、標識したリガンドの該細胞または該膜画分に対する結合量を測定して比較し、標識したリガンドより本発明のポリペプチドのアゴニスト、アンタゴニストまたは機能修飾物質を選択することを特徴とする、本発明のポリペプチドのアゴニスト、アンタゴニストまたは機能修飾物質のスクリーニング方法、(c) ①リガンドを本発明のポリペプチドを含有する細胞または該細胞の膜画分に接触させた場合と、②リガンドと試験物質

を本発明のポリペプチドを含有する細胞または該細胞の膜画分に接触させた場合における、標識したGTPγSのGα蛋白質(膜画分)への結合量を測定して比較し、試験物質より本発明のポリペプチドのアゴニスト、アンタゴニストまたは機能修飾物質を選択することを特徴とする本発明のポリペプチドのアゴニスト、アンタゴニストまたは機能修飾物質のスクリーニング方法、(d) ①リガンドを本発明のポリペプチドを含有する細胞または該細胞の膜画分に接触させた場合と、②リガンドと試験物質を本発明の受容体蛋白質を含有する細胞または該細胞の膜画分に接触させた場合におけるGTPase活性を測定して比較し、試験物質より本発明のポリペプチドのアゴニスト、アンタゴニストまたは機能修飾物質を選択することを特徴とする、本発明のポリペプチドのアゴニスト、アンタゴニストまたは機能修飾物質のスクリーニング方法、(e) ①リガンドを本発明のポリペプチドを含有する細胞または該細胞の膜画分に接触させた場合と、②リガンドと試験物質を本発明のポリペプチドまたは部分ペプチドを含有する細胞または該細胞の膜画分に接触させた場合における本発明のポリペプチドを介した細胞刺激活性(例えば、アラキドン酸遊離、アセチルコリン遊離、細胞内Ca²⁺遊離、細胞内cAMP生成、細胞内cGMP生成、イノシトールリン酸産生、細胞膜電位変動、細胞内蛋白質のリン酸化、c-fos活性化、pHの低下、細胞増殖活性、メラニン色素の凝集または拡散、またはレポーター遺伝子の発現量などを促進する活性または抑制する活性など)を測定して比較し、試験物質より本発明のポリペプチドのアゴニスト、アンタゴニストまたは機能修飾物質を選択することを特徴とする、本発明の受容体蛋白質のアゴニスト、アンタゴニストまたは機能修飾物質のスクリーニング方法、(f) 試験物質を本発明のポリペプチドを含有する細胞または該細胞の膜画分に接触させた場合における、標識したGTPγSのGα蛋白質(膜画分)への結合量を測定し、試験物質より本発明のポリペプチドのアゴニストまたは機能修飾物質を選択することを特徴とする、本発明のポリペプチドのアゴニストまたは機能修飾物質のスクリーニング方法、(g) 試験物質を本発明のポリペプチドを含有する細胞または該細胞の膜画分に接触させた場合におけるGTPase活性を測定し、試験物質より本発明のポリペプチドのアゴニストまたは機能修飾物質を選択することを特徴とする本発明のポリペプチドのアゴニストまたは機能修飾物質のスクリーニング方法、(h) 試験物質を、本発明のポリペプチドを含有する細胞に接触させた場合における、本発明のポリペプチドまたは部分ペプチドを介した細胞刺激活性(例えば、アラキドン酸遊離、アセチルコリン遊離、細胞内Ca²⁺遊離、細胞内cAMP生成、細胞内cGMP生成、イノシトールリン酸産生、細胞膜電位変動、細胞内蛋白質のリン酸化、c-fos活性化、pHの低下、メラニン色素の凝集または

拡散、またはレポーター遺伝子の発現量などを促進する活性または抑制する活性など)を測定し、試験物質より本発明のポリペプチドのアゴニストまたは機能修飾物質を選択することを特徴とする、本発明のポリペプチドのアゴニストまたは機能修飾物質のスクリーニング方法、

(i) 上記(a)～(h)において、本発明のポリペプチドとして構成活性型に変異させたポリペプチドを使用することを特徴とする本発明のポリペプチドのアゴニスト、アンタゴニストまたは機能修飾物質のスクリーニング方法、をあげることができる。

【0181】上記(a)および(b)で選択された物質は、上記(c)～(i)の方法を用いて、アゴニスト、アンタゴニストまたは機能修飾物質かを区別することができる。一方、上記(a)～(i)の方法で選択された物質の中には、本発明のポリペプチドのアゴニストやアンタゴニストではないが、本発明のポリペプチドの機能を修飾できる物質(機能修飾物質)も含まれる。例えば、(a)～(i)の方法で選択された物質の中には、本発明のポリペプチドとG蛋白質の共役を阻害したり増強したりする物質も含まれると考えられる。また、

(c)～(i)の方法で選択された物質の中には、本発明のポリペプチドより下流のシグナルを阻害したり増強する物質も含まれると考えられる。これら機能修飾物質も医薬品の候補として有用である。

【0182】上記方法による本発明のポリペプチドのアゴニスト、アンタゴニストまたは機能修飾物質のスクリーニング方法の詳細な説明を以下にする。

(I) リガンドの結合量を測定する方法

上記(a)および(b)に示したように、本発明のポリペプチドまたは部分ペプチド若しくはそれらの塩、あるいは本発明のポリペプチドまたは部分ペプチドを発現する細胞に対して試験物質と標識したリガンドを作用させ、本発明のポリペプチドまたは部分ペプチド若しくはその塩に対するリガンドの結合量を測定することにより、本発明のポリペプチドに対するアゴニスト、アンタゴニストまたは機能修飾物質のスクリーニングを行うことができる。

【0183】標識したリガンドとしては、標識したリガンド、標識したリガンドアナログ化合物などを用いることができる。例えば $[^3\text{H}]$ 、 $[^{125}\text{I}]$ 、 $[^{14}\text{C}]$ 、 $[^{35}\text{S}]$ などで標識されたリガンドなどを用いることができる。

【0184】試験物質としてはいかなる物質も使用できるが、例えば、既知ペプチド、既知GPCRリガンド、既知蛋白質、組換え技術を用いて生産された組換え蛋白質、細胞抽出液や該抽出液由来の精製物、細胞培養上清や該上清由来の精製物、血清などの生体試料や該生体試料由来の精製物、微生物の菌体抽出液や該抽出液由来の精製物、微生物培養上清や該上清由来の精製物、既知化合物、コンビナトリアルケミストリーを用いて合成され

た化合物などを使用することができる。

【0185】本方法に用いる本発明のポリペプチドまたは部分ペプチドとしては、該ポリペプチドまたは部分ペプチドを含有するものであれば何れのものであってもよく、該ポリペプチドまたは部分ペプチドを含有する細胞から精製した該ポリペプチドまたは部分ペプチドでもよいし、該ポリペプチドまたは部分ペプチドを含有する細胞そのものまたはその細胞膜画分を用いてもよい。該ポリペプチドまたは部分ペプチドを含有する細胞を用いる場合、該細胞をグルタルアルデヒド、ホルマリンなどで固定化してもよい。

【0186】また、本発明のポリペプチドまたは部分ペプチドとしては、天然に存在するポリペプチドまたは部分ペプチド、あるいは遺伝子組換えの手法を用いて作製した組換えポリペプチドまたは組換え部分ペプチドのいずれでもよいが、(3)に記載の方法により、配列番号2で表される塩基配列を有するDNAに変異を導入して得られる変異DNAにコードされるポリペプチドのうち、構成的に活性型となった変異型ポリペプチドは特に有用である。

【0187】構成活性型に変異したGPCRについては(6-1)に記載したように、該変異GPCRでは、アゴニストとの親和性が増加する場合があることが知られていることから、構成活性型の変異GPCRはアゴニストの探索において有用である。アンタゴニストの探索には、普通はリガンドを使用する必要があるが、リガンドが不明のGPCR(オーファンGPCRと呼ばれる)の場合はリガンドを使用することができない。しかし、天然型または変異型の構成活性型GPCRを用いれば、リガンドがなくてもアンタゴニストの探索が可能になる。例えば、構成活性型GPCRポリペプチドを細胞に過剰に発現させた際に流れるシグナルやG蛋白質の活性化を抑制する物質を探索することにより、アンタゴニストを選択することが可能である。この際、アンタゴニストとともにGPCRの機能修飾物質も選択されうる。また、構成活性型GPCRポリペプチドを細胞に過剰に発現させた際に流れるシグナルやG蛋白質の活性化を増強する物質を探索することにより、アゴニストや機能修飾物質も選択することができる。

【0188】GPCRに変異が生じて構成活性型に変化したことが原因で起こる疾患が多数知られている〔日本臨床、56, 1658 (1998)、日本臨床、56, 1843 (1998)、日本臨床、56, 1856 (1998)、日本臨床、56, 1931 (1998)、Trends in Endocrinology and Metabolism, 9, 27 (1998)、Endocrinology, 137, 3936 (1996)〕。これらの構成活性型変異GPCRの活性を抑制できるアンタゴニスト(インバースアゴニストと呼ばれる)は、構成活性型変異GPCRが原因で起こる疾患の治療に有用である。アンタゴニストは、ニュートラルアンタゴニストとインバースアゴニストに分類される。インバースアゴニ

ストは構成活性型GPCRの活性を抑制することができるが、ニュートラルアンタゴニストは構成的活性を抑制することができない。構成活性型変異GPCRは、インバースアゴニストの探索に有用である。

【0189】上記方法に用いられる細胞膜画分は、上記(6-1)に記載した方法により調製することができる。

【0190】本発明のポリペプチドまたは部分ペプチドを発現する細胞としては、上記(4)に記載したように、該ポリペプチドをコードするDNAを含む組換え体DNAを適当な宿主細胞に導入して得られる形質転換細胞のように大量に該ポリペプチドを発現している細胞を用いることもできる。宿主細胞としては大腸菌、枯草菌、酵母などの微生物の他、昆虫細胞、カエルの卵母細胞、カエルのメラニン細胞、動物細胞、植物細胞などが用いられる。該形質転換細胞が発現する本発明のポリペプチドが高次構造を保ち、リガンドとの結合性を保持するためには、酵母、昆虫細胞、カエルの卵母細胞、カエルのメラニン細胞、動物細胞、植物細胞などで発現させるのが好ましい。酵母の変異株や改変G α 蛋白質を発現させた酵母などを宿主として利用することもできる〔Trends in Biotechnology, 15, 487 (1997)、Mol. Cell. Biol., 15, 6188 (1995)、Mol. Cell. Biol., 16, 4700 (1996)〕。

【0191】本発明のポリペプチドまたは部分ペプチドを含有する細胞やその細胞膜画分中のGPCRの量は、1細胞当たり $10^3 \sim 10^8$ 分子であるのが好ましく、 $10^5 \sim 10^7$ 分子であるのが好適である。なお、発現量が多いほど膜画分当たりのリガンド結合活性(比活性)が高くなり、高感度なスクリーニング系の構築が可能になるばかりでなく、同一ロットで大量の試料を測定できるようになる。

【0192】以下、具体例を示す。

【0193】本発明のポリペプチドまたは部分ペプチドの標品を、上記(6-1)に記載した方法により調製する。 $10 \mu\text{l} \sim 10\text{ml}$ の該ポリペプチドまたは部分ペプチド標品に、試験物質と放射性同位元素(^3H 、 ^{125}I 、 ^{14}C 、 ^{35}S 、 ^{32}P など)で標識した一定の放射エネルギーのリガンドを共存させる。非特異的結合量(NSB)を知るために大過剰の未標識のリガンドを加えた反応チューブも用意する。反応は約 $0 \sim 50^\circ\text{C}$ 、望ましくは約 $4 \sim 37^\circ\text{C}$ で、約20分 \sim 24時間、望ましくは約30分 \sim 3時間行なう。反応後、ガラス繊維濾紙等で濾過し、適量の同バッファで洗浄した後、ガラス繊維濾紙に残存する放射活性を液体シンチレーションカウンターあるいは γ -カウンターで計測する。全結合量(B)から非特異的結合量(NSB)を引いたカウント(B-NSB)が特異的結合量である。試験物質非存在下におけるリガンドの特異的結合量と、試験物質存在下におけるリガンドの特異的結合量を比較して、リガンドの特異的結合量を減少させ

る物質を本発明の受容体蛋白質のアゴニスト、アンタゴニストまたは機能修飾物質として選択することができる。

【0194】上記方法において、本発明のポリペプチドまたは部分ペプチドを含有する細胞として、本発明のポリペプチドを発現しない宿主細胞に該ポリペプチドまたは該部分ペプチドをコードするDNAをベクターDNAに組み込んだ組換え体DNAを導入して得られる該ポリペプチドまたは該部分ペプチドの大量発現細胞を用いることにより、本発明の受容体蛋白質のアゴニスト、アンタゴニストまたは機能修飾物質をより感度良く選択することができる。また、同宿主細胞にベクターのみを導入することによって得られる該ポリペプチドを発現しない細胞や、同宿主細胞に他のG蛋白質共役型受容体ポリペプチドの発現プラスミドを導入することによって得られる他のG蛋白質共役型受容体ポリペプチドの発現細胞を用いて同様の実験を行うことにより、取得したアゴニスト、アンタゴニストまたは機能修飾物質の本発明のG蛋白質共役型受容体ポリペプチドに対する特異性を調べることができる。

(II) GTP γ SのG α 蛋白質への結合量を測定する方法

上記(c)に示したように、本発明のポリペプチドを含有する細胞の膜画分に試験物質とリガンドを接触させ、標識したGTP γ SのG α 蛋白質(膜画分)への結合量を測定することにより、該GPCRのアゴニスト、アンタゴニストまたは機能修飾物質をスクリーニングすることができる〔Molecular Pharmacology, 47, 848-854 (1995)、W098/46995〕。

【0195】また、上記(f)に示したように、本発明のポリペプチドを含有する細胞の膜画分に試験物質を接触させ、標識したGTP γ SのG α 蛋白質(膜画分)への結合量を測定することにより、該ポリペプチドのアゴニストまたは機能修飾物質をスクリーニングすることができる〔Molecular Pharmacology, 47, 848-854 (1995)、W098/46995〕。

【0196】試験物質としてはいかなる物質も使用できるが、例えば、既知ペプチド、既知GPCRリガンド、既知蛋白質、組換え技術を用いて生産された組換え蛋白質、細胞抽出液や該抽出液由来の精製物、細胞培養上清や該上清由来の精製物、血清などの生体試料や該生体試料由来の精製物、微生物の菌体抽出液や該抽出液由来の精製物、微生物培養上清や該上清由来の精製物、既知化合物、コンビナトリアルケミストリーを用いて合成された化合物などを使用することができる。標識したGTP γ Sとしては、例えば ^{35}S で標識したGTP γ Sを用いることができる。

【0197】本発明のポリペプチドを含有する細胞または該細胞の膜画分としては、上記(I)に記載したものを使用することができる。

【0198】以下、具体例を示す。

【0199】本発明のポリペプチド標品を、上記(6-1)に記載した方法により調製する。

【0200】アゴニストのスクリーニングの際には、10 μ l~10mlの該ポリペプチド標品に、試験物質、放射性同位元素(35 Sなど)で標識した一定の放射エネルギーのGTP γ S、およびGDPを共存させる。非特異的結合量(NSB)を知る必要がある場合には、大過剰の未標識のGTP γ Sを加えた反応チューブを用意する。全結合量(B)から非特異的結合量(NSB)を引いたカウント(B-NSB)が特異的結合量である。反応は約0~50℃、望ましくは約4~37℃で、約20分~24時間、望ましくは約30分~3時間行なう。反応後、ガラス繊維濾紙等で濾過し、適量の同バッファーで洗浄した後、ガラス繊維濾紙に残存する放射活性を液体シンチレーションカウンターで計測する。GTP γ Sの膜画分への結合を増強する活性を有する物質を、本発明のポリペプチドのアゴニストまたは機能修飾物質として選択することができる。

【0201】アンタゴニストや機能修飾物質のスクリーニングの際には、10 μ l~10 mlの上記ポリペプチド標品に、リガンド、試験物質、放射性同位元素(35 Sなど)で標識した一定の放射エネルギーのGTP γ S、およびGDPを共存させて同様の実験を行う。試験物質非存在下におけるGTP γ Sの結合量と、試験物質存在下におけるリガンドの結合量を比較して、GTP γ Sの結合量を減少させる物質を本発明のポリペプチドのアンタゴニストまたは機能修飾物質として選択することができる。一方、GTP γ Sの結合量を増加させる物質を本発明のポリペプチドの機能修飾物質またはアゴニストとして選択することができる。

【0202】本発明のポリペプチドを含有する細胞として、本発明のポリペプチドを発現しない宿主細胞に該ポリペプチドをコードするDNAをベクターに組み込んだ組換え体DNAを導入して得られる該ポリペプチドの大量発現細胞を用いることにより、本発明の受容体蛋白質のアゴニスト、アンタゴニストまたは機能修飾物質をより感度良く選択することができる。また、同宿主細胞にベクターのみを導入することによって得られる該ポリペプチドを発現しない細胞や、同宿主細胞に他のG蛋白質共役型受容体ポリペプチドの発現プラスミドを導入することによって作製した他のG蛋白質共役型受容体ポリペプチドの発現細胞を用いて同様の実験を行うことにより、取得したアゴニスト、アンタゴニストまたは機能修飾物質の本発明のG蛋白質共役型受容体ポリペプチドに対する特異性を調べることができる。

(III) GTPase活性を測定する方法

上記(d)に示したように、本発明のポリペプチドを含有する細胞の膜画分にリガンドと試験物質を接触させ、GTPase活性を測定することにより、該ポリペプチ

ドのアゴニスト、アンタゴニストまたは機能修飾物質をスクリーニングすることができる[J. Biol. Chem., 271, 1857-1860 (1996)、W098/46995]。

【0203】また、上記(e)に示したように、本発明のポリペプチドを含有する細胞の膜画分に試験物質を接触させ、GTPase活性を測定することにより、該ポリペプチドのアゴニストまたは機能修飾物質をスクリーニングすることができる[J. Biol. Chem., 271, 1857-1860 (1996)、W098/46995]。

【0204】試験物質としてはいかなる物質も使用できるが、例えば、既知ペプチド、既知GPCRリガンド、既知蛋白質、組換え技術を用いて生産された組換え蛋白質、細胞抽出液や該抽出液由来の精製物、細胞培養上清や該上清由来の精製物、血清などの生体試料や該生体試料由来の精製物、微生物の菌体抽出液や該抽出液由来の精製物、微生物培養上清や該上清由来の精製物、既知化合物、コンビナトリアルケミストリーを用いて合成された化合物などを使用することができる。

【0205】本発明のポリペプチドを含有する細胞または該細胞の膜画分としては、上記(I)に記載したものを使用することができる。

【0206】以下、具体例を示す。

【0207】本発明のポリペプチド標品を、上記(6-1)に記載した方法により調製する。

【0208】アゴニストのスクリーニングの際には、10 μ l~10 mlの該ポリペプチド標品に、試験化合物、放射性同位元素(32 Pなど)で標識した一定の放射エネルギーのGTP(例えば[γ 32 P]GTP)を共存させる。反応は約0~50℃、望ましくは約4~37℃で、約20分~24時間、望ましくは約30分~3時間行なう。反応後、反応液の上清を回収し、放出された[γ 32 P]Piの放射活性を液体シンチレーションカウンターで計測する。反応液をガラス繊維濾紙等で濾過し、適量の同バッファーで洗浄した後、濾過液中の放射活性を液体シンチレーションカウンターで計測してもよい。GTPase活性を増強する活性を有する物質を、本発明のポリペプチドのアゴニストまたは機能修飾物質として選択することができる。

【0209】アンタゴニストや機能修飾物質のスクリーニングの際には、10 μ l~10 mlの該ポリペプチド標品に、リガンド、試験化合物、放射性同位元素(32 Pなど)で標識した一定の放射エネルギーのGTP(例えば[γ 32 P]GTP)を共存させて同様の実験を行う。試験物質非存在下におけるGTPase活性と、試験物質存在下におけるGTPase活性を比較して、GTPase活性を減少させる物質を本発明のポリペプチドのアンタゴニストまたは機能修飾物質として選択することができる。一方、GTPase活性を増加させる物質を本発明のポリペプチドの機能修飾物質またはアゴニストとして選択することができる。

【0210】本発明のポリペプチドを含有する細胞として、本発明のポリペプチドを発現しない宿主細胞に該ポリペプチドをコードするDNAをベクターに組み込んだ組換え体DNAを導入することによって得られる該ポリペプチドの大量発現細胞を用いることにより、本発明の受容体蛋白質のアゴニスト、アンタゴニストまたは機能修飾物質をより感度良く選択することができる。また、同宿主細胞にベクターのみを導入することによって得られる該ポリペプチドを発現しない細胞や、同宿主細胞に他のG蛋白質共役型受容体ポリペプチドの発現プラスミドを導入することによって得られる他のG蛋白質共役型受容体ポリペプチドの発現細胞を用いて同様の実験を行うことにより、取得したアゴニスト、アンタゴニストまたは機能修飾物質の本発明のG蛋白質共役型受容体ポリペプチドに対する特異性を調べることができる。

(IV) 細胞の応答を検出する方法

上記(e)に示したように、本発明のポリペプチドを発現する細胞にリガンドと試験物質を接触させ、該ポリペプチドの活性化を細胞の応答を指標として検出することにより、該ポリペプチドのアゴニスト、アンタゴニストまたは機能修飾物質をスクリーニングすることができる。

【0211】また、上記(h)に示したように、本発明のポリペプチドを発現する細胞に試験物質を接触させ、該ポリペプチドの活性化を細胞の応答を指標として検出することにより、該ポリペプチドのアゴニストまたは機能修飾物質をスクリーニングすることができる。

【0212】細胞の応答としては、例えば、アラキドン酸遊離、アセチルコリン遊離、細胞内 Ca^{2+} 遊離、細胞内cAMP生成、細胞内cAMP減少、細胞内cGMP生成、イノシトールリン酸産生、細胞膜電位変動、細胞内蛋白質のリン酸化、c-fos活性化、pHの低下、細胞増殖活性、メラニン色素の凝集または拡散などを測定する。また、レポーター系を用いて細胞の応答をモニターすることもできる。例えば、機能的な本発明のポリペプチドを発現する細胞に、該ポリペプチドの活性化により発現が誘導される遺伝子のプロモーター配列の下流に適当なレポーター遺伝子を連結したDNAを導入することにより、該ポリペプチドの活性化をレポーター遺伝子の発現で測定することができる。該プロモーターとしては、例えばICAM-1遺伝子のプロモーター、c-fosのプロモーター、Krox-24のプロモーターなどが利用できる。また、該プロモーターは、適当な転写因子の結合配列と基本プロモーターからなる人工プロモーターでもよい。転写因子の結合配列としては、例えばCRE、TRE、SRE、などが利用できる。レポーター遺伝子としては、クロラムフェニコール・アセチルトランスフェラーゼ遺伝子、 β -グルクロニダーゼ遺伝子、 β -ガラクトシダーゼ遺伝子、 β -ラクタマーゼ遺伝子、ルシフェラーゼ遺伝子、エクオリン遺伝子および

グリーン・フルオレッセント・プロテイン遺伝子などが利用できる。

【0213】本発明のポリペプチドを発現する細胞としては、上記(4)に記載したように、該ポリペプチドをコードするDNAを含む組換え体DNAを適当な宿主細胞に導入して得られる形質転換細胞のように、大量に該ポリペプチドを発現している細胞を用いることもできる。該宿主細胞としては、大腸菌、枯草菌、酵母などの微生物の他、昆虫細胞、カエルの卵母細胞、カエルのメラニン細胞、動物細胞、植物細胞などが用いられる。該形質転換細胞が発現する本発明のポリペプチドが高次構造を保持し、リガンドとの結合性や機能性を保持するためには、酵母、昆虫細胞、カエルの卵母細胞、カエルのメラニン細胞、動物細胞、植物細胞などで発現させるのが好ましい。酵母の変異株や改変G α 蛋白質を発現させた酵母などを宿主として利用することもできる。

【0214】試験物質としてはいかなる物質も使用できるが、例えば、既知ペプチド、既知GPCRリガンド、既知蛋白質、組換え技術を用いて生産された組換え蛋白質、細胞抽出液や該抽出液由来の精製物、細胞培養上清や該上清由来の精製物、血清などの生体試料や該生体試料由来の精製物、微生物の菌体抽出液や該抽出液由来の精製物、微生物培養上清や該上清由来の精製物、既知化合物、コンビナトリアルケミストリーを用いて合成された化合物などを使用することができる。

【0215】以下具体例を示す。

①アゴニストのスクリーニング方法

本発明のポリペプチドを発現する細胞をマルチウェルプレート等に培養する。必要に応じて新鮮な培地あるいは細胞に毒性を示さない適当なバッファーに交換し、試験物質を添加して一定時間インキュベートする。その後、細胞の応答(例えば、アラキドン酸遊離、アセチルコリン遊離、細胞内 Ca^{2+} 遊離、細胞内cAMP生成、細胞内cGMP生成、イノシトールリン酸産生、細胞膜電位変動、細胞内蛋白質のリン酸化、c-fos活性化、pHの低下、メラニン色素の凝集または拡散、またはレポーター遺伝子の発現量などを促進する活性または抑制する活性など)を測定する。例えば、細胞の抽出液や上清を用いて、細胞の応答により生成した産物を常法に従って定量する。細胞刺激活性の指標とする物質(例えば、アラキドン酸など)の生成が、細胞が含有する分解酵素によって検定困難な場合は、該分解酵素に対する阻害剤を添加して定量してもよい。また、cAMP産生抑制などの活性については、フォルスコリンなどで細胞のcAMP産生量を増大させておいた細胞に対する産生抑制作用として検出することができる。細胞の応答を増強する活性を有する物質を、本発明のポリペプチドのアゴニストまたは機能修飾物質として選択することができる。

②アンタゴニストまたは機能修飾物質のスクリーニング

10

20

30

40

50

本発明のポリペプチドを発現する細胞をマルチウェルプレート等に培養する。必要に応じて新鮮な培地あるいは細胞に毒性を示さない適当なバッファーに交換し、リガンドと試験物質を添加して一定時間インキュベートする。その後、上記と同様の方法により細胞の応答を測定する。試験物質非存在下における細胞応答と、試験物質存在下における細胞応答を比較して、細胞応答を減少させる物質を本発明のポリペプチドのアнтаゴニストまたは機能修飾物質として選択することができる。一方、細胞応答を増加させる物質を本発明のポリペプチドの機能修飾物質またはアゴニストとして選択することができる。

【0216】本発明のポリペプチドを含有する細胞として、本発明のポリペプチドを発現しない宿主細胞に該ポリペプチドをコードするDNAをベクターに組み込んだ組換え体DNAを導入して得られる該ポリペプチドの大量発現細胞を用いることにより、本発明の受容体蛋白質のアゴニスト、アンタゴニストまたは機能修飾物質をより感度良く選択することができる。また、同宿主細胞にベクターのみを導入することによって得られる該ポリペプチドを発現しない細胞や、同宿主細胞に他のG蛋白質共役型受容体ポリペプチドの発現プラスミドを導入することによって得られる他のG蛋白質共役型受容体ポリペプチドの発現細胞を用いて同様の実験を行うことにより、取得したアゴニスト、アンタゴニストまたは機能修飾物質の本発明のG蛋白質共役型受容体ポリペプチドに対する特異性を調べることができる。

(6-5) 本発明のG蛋白質共役型受容体ポリペプチドのアゴニスト、アンタゴニストまたは機能修飾物質のスクリーニング用キット

本発明のポリペプチドのアゴニスト、アンタゴニストまたは機能修飾物質のスクリーニング用キットは、本発明のポリペプチドまたはその部分ペプチドもしくはそれらの塩、または本発明のポリペプチドまたはその部分ペプチドを含有する細胞または該細胞の膜画分を含有するものなどである。本発明のスクリーニング用キットとして、たとえば下記の試薬と測定法をあげることができる。

(a) スクリーニング用試薬

①測定用緩衝液および洗浄用緩衝液

Hanks' Balanced Salt Solution (ギブコ社製) に、0.05%のウシ血清アルブミン(シグマ社製)を加えたもの。孔径0.45 μm のフィルターで濾過滅菌し、4°Cで保存するか、あるいは用時調製しても良い。

②本発明のポリペプチド標品

本発明のポリペプチドを発現させたCHO細胞を、12穴プレートに5 \times 10⁵個/穴で継代し、5%CO₂、95%air インキュベーター中、37°Cで2日間培養したもの。

③標識リガンド

市販の [³H]、[¹²⁵I]、[¹⁴C]、[³⁵S] などで標識したリガンド。水溶液の状態のものを4°Cあるいは-20°Cにて保存し、用時に測定用緩衝液にて1 $\mu\text{mol/L}$ に希釈する。

④リガンド標準液

リガンドを0.1%ウシ血清アルブミン(シグマ社製)を含むPBSで1mmol/Lとなるように溶解し、-20°Cで保存する。

(b) 測定法

10 ①12穴組織培養用プレートにて培養した本発明のポリペプチド発現CHO細胞を、測定用緩衝液1mlで2回洗浄した後、490 μl の測定用緩衝液を各穴に加える。

②10⁻³~10⁻¹⁰ mol/Lの試験物質溶液を5 μl 加えた後、標識リガンドを5 μl 加え、室温にて1時間反応させる。非特異的結合量を知るためには試験物質のかわりに10⁻³ mol/Lのリガンドを5 μl 加えておく。

20 ③反応液を除去し、1mlの洗浄用緩衝液で3回洗浄する。細胞に結合した標識リガンドを溶解液(0.2mol/L NaOH、1%SDS)で溶解し、4mlの液体シンチレーターA(和光純薬製)と混合する。

④液体シンチレーションカウンター(ベックマン社製)を用いて放射活性を測定し、Percent Maximum Binding (PMB)を下記式で求める。

$$\text{PMB} = (\text{B} - \text{NSB}) \div \text{B0} \times 100$$

PMB: Percent Maximum Binding

B: 検体を加えた時の値

NSB: Non-specific Binding (非特異的結合量)

B0: 最大結合量

30 上記(6-4)のスクリーニング方法または本スクリーニング用キットを用いて得られる物質またはその塩は、本発明のポリペプチドのアゴニスト、アンタゴニストまたは機能修飾物質である。該物質としては、ペプチド、タンパク、非ペプチド性化合物、合成化合物、発酵生産物などが挙げられ、これら物質は新規な物質であってもよいし、公知の物質であってもよいが、該公知物質は、本発明のアゴニスト、アンタゴニストまたは機能修飾物質には含まれない。本発明のポリペプチドに対するアゴニストは、本発明のポリペプチドに対するリガンドが有する生理活性と同様の作用を有しているので、該リガンド活性に応じて安全で低毒性な医薬組成物として有用である。逆に、本発明のポリペプチドに対するアンタゴニストは、本発明のポリペプチドに対するリガンドが有する生理活性を抑制することができるので、該リガンド活性を抑制する安全で低毒性な医薬組成物として有用である。また、本発明のポリペプチドの機能修飾物質は、本発明のポリペプチドに対するリガンドが有する生理活性を増強または抑制することができるので、該リガンド活性を増強または抑制する安全で低毒性な医薬組成物として有用である。

【0217】上記(6-4)のスクリーニング方法または本スクリーニング用キットを用いて得られる化合物またはその塩を上記の医薬組成物として使用する場合、常法に従って製剤化することができる。例えば、必要に応じて糖衣を施した錠剤、カプセル剤、エリキシル剤、マイクロカプセル剤などとして経口的に、あるいは水もしくはそれ以外の薬学的に許容し得る液との無菌性溶液、または懸濁液剤などの注射剤の形で非経口的に使用できる。例えば、該化合物またはその塩を生理学的に認められる担体、香味剤、賦形剤、ベヒクル、防腐剤、安定剤、結合剤などとともに一般に認められた製薬実施に要求される単位用量形態で混和することによって製造することができる。これら製剤における有効成分量は指示された範囲の適当な容量が得られるようにするものである。錠剤、カプセル剤などに混和することができる添加剤としては、例えば、ゼラチン、コーンスターチ、トラガント、アラビアガムのような結合剤、結晶性セルロースのような賦形剤、コーンスターチ、ゼラチン、アルギン酸などのような膨化剤、ステアリン酸マグネシウムのような潤滑剤、ショ糖、乳糖またはサッカリンのような甘味剤、ペパーミント、アカモノ油またはチェリーのような香味剤などが用いられる。調剤単位形態がカプセルである場合には、前記タイプの材料にさらに油脂のような液状担体を含有することができる。注射のための無菌組成物は注射用水のようなベヒクル中の活性物質、胡麻油、椰子油などのような天然産出植物油などを溶解または懸濁させるなどの通常の製剤実施にしたがって処方することができる。

【0218】注射用の水性液としては、例えば、生理食塩水、ブドウ糖やその他の補助薬を含む等張液(例えば、D-ソルビトール、D-マンニトール、塩化ナトリウムなど)などが用いられ、適当な溶解補助剤、例えば、アルコール(例えば、エタノール)、ポリアルコール(例えば、プロピレングリコール、ポリエチレングリコール)、非イオン性界面活性剤(例えば、ポリソルベート80(TM)、HCO-50)などと併用してもよい。油性液としては、例えば、ゴマ油、大豆油などが用いられ、溶解補助剤である安息香酸ベンジル、ベンジルアルコールなどと併用してもよい。また、緩衝剤(例えば、リン酸塩緩衝液、酢酸ナトリウム緩衝液)、無痛化剤(例えば、塩化ベンザルコニウム、塩酸プロカインなど)、安定剤(例えば、ヒト血清アルブミン、ポリエチレングリコールなど)、保存剤(例えば、ベンジルアルコール、フェノールなど)、酸化防止剤などと配合してもよい。調整された注射液は通常、適当なアンプルに充填される。このようにして得られる製剤は安全で低毒性であるので、例えば、ヒトや哺乳動物(例えば、ラット、ウサギ、ヒツジ、ブタ、ウシ、ネコ、イヌ、サルなど)に対して投与することができる。該化合物またはその塩の投与量は、投与対象、対象臓器、症状、投与方法

などにより差異はあるが、経口投与の場合、一般的に成人(60kgとして)においては、一日につき約0.1~100mg、好ましくは約1.0~50mg、より好ましくは約1.0~20mgである。非経口的に投与する場合は、その1回投与量は投与対象、対象臓器、症状、投与方法などによっても異なるが、例えば、注射剤の形で通常成人(60kgとして)においては、一日につき約0.01~30mg程度、好ましくは約0.1~20mg程度、より好ましくは約0.1~10mg程度を静脈注射により投与するのが好都合である。他の動物の場合も、60kg当りに換算した量を投与することができる。

(7) 本発明のDNAまたはオリゴヌクレオチドの利用
(7-1) 本発明のポリペプチドをコードする染色体遺伝子の取得および該遺伝子の利用

(I) 本発明のポリペプチドをコードする染色体遺伝子の取得

本発明のDNAまたはオリゴヌクレオチドをプローブとして、公知の方法〔東京大学医科学研究所 制癌研究部編、新細胞工学実験プロトコル、秀潤社(1993年)〕を用いて、本発明のポリペプチドをコードする染色体遺伝子および該遺伝子の発現制御領域を取得することが可能である。

【0219】また、本発明のポリペプチドをコードするヒトcDNAの配列と、公開されているデータベースに登録されているヒト染色体遺伝子の配列とを比較することにより、本発明のポリペプチドをコードするヒト染色体遺伝子を同定し、その構造を明らかにできる可能性がある。cDNAの配列と一致する染色体遺伝子配列が登録されていれば、本発明のDNAの配列と染色体遺伝子の配列を比較することにより、本発明のポリペプチドをコードする染色体遺伝子のエクソンおよびイントロン構造、ならびに該染色体遺伝子の発現制御領域(例えばプロモーター領域など)を決定することができる。

【0220】プロモーター領域としては、哺乳動物細胞において本発明のポリペプチドをコードする遺伝子の転写に関与するすべてのプロモーター領域があげられる。具体的には、例えば、ヒトの視床、小脳、全脳、海馬、黒質、胎児脳、胎児腎、胎児肝臓、心臓、肝臓、乳腺、胎盤、前立腺、唾液腺、骨格筋、胸腺、甲状腺、子宮、ヒト大腸癌細胞、またはヒト胃癌細胞において、本発明のポリペプチドをコードする遺伝子の転写に関与するプロモーター領域をあげることができる。

【0221】上記プロモーター領域の具体的例としては、配列番号15に記載の塩基配列において塩基番号20202~25202番で表される塩基配列を有するDNA中、50~5000bpの連続した塩基配列を有するDNAをあげることができる。

(II) 本発明のポリペプチドをコードする染色体遺伝子および該遺伝子の利用方法

下記(8)で示すように、該プロモーター領域は本発明のポリペプチドをコードする遺伝子の転写を制御する物質のスクリーニングに有用である。また、該プロモーター領域の配列情報を用いて、本発明のポリペプチドをコードする遺伝子の転写を抑制するためのデコイDNA

〔Nippon Rinsho - Japanese Journal of Clinical Medicine, 56, 563 (1998)、Circulation Research, 82, 1023 (1998)、Experimental Nephrology, 5, 429 (1997)、Nippon Rinsho - Japanese Journal of Clinical Medicine, 54, 2583 (1996)〕を作製することができる。

(7-2) 本発明のG蛋白質共役型受容体ポリペプチドをコードする遺伝子の転写産物量の測定

ノーザンハイブリダイゼーション法(モレキュラー・クロニング第2版)、PCR法〔PCR Protocols, Academic Press (1990)〕、定量的PCR法〔Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 87, 2725 (1990)〕、Real Time PCR法〔Junko Stevens, 実験医学(増刊), 15, 46 (1997)〕等の方法により、本発明のポリペプチドをコードする遺伝子の転写産物量を測定することができる。特に、定量的PCR法やReal Time PCR法は定量性に優れている点で好ましい方法である。該転写産物を定量することにより、本発明のポリペプチドの発現異常に基づく疾患の診断が可能である。したがって、本発明のDNAまたはオリゴヌクレオチドは、本発明のポリペプチドをコードする遺伝子の転写産物を定量するための遺伝子診断剤として有用である。

(7-3) 本発明のG蛋白質共役型受容体ポリペプチドをコードする遺伝子の変異および多型の検出

GPCR遺伝子またはGPCR遺伝子の発現制御領域には変異や多型が存在することが知られている。例えば、GPCR遺伝子の変異によりGPCRの機能が不活性化または活性化し、各種の疾患が起こることが知られている〔日本臨床, 56, 1658 (1998)、日本臨床, 56, 1836 (1998)、日本臨床, 56, 1843 (1998)、日本臨床, 56, 1848 (1998)、日本臨床, 56, 1856 (1998)、日本臨床, 56, 1871 (1998)、日本臨床, 56, 1876 (1998)、日本臨床, 56, 1931 (1998)、Trends in Endocrinology and Metabolism, 9, 27 (1998)〕。また、GPCR遺伝子またはGPCR遺伝子の発現制御領域の変異によりGPCRの発現量が増加または低下し、各種の疾患が起こる場合もある。したがって、本発明のポリペプチドをコードする遺伝子または該遺伝子の発現制御領域の変異を調べることにより、本発明の受容体蛋白質の機能の不活性化または活性化、あるいは本発明のポリペプチドの発現の増加または低下に基づく疾患の診断を行うことができる。

【0222】また、GPCR遺伝子やGPCR遺伝子の発現制御領域の多型により、GPCRの性質やGPCRの発現量が変化し、疾患の発症率や進展速度が異なることが知られている〔Cancer. Res., 59, 3561 (1999)、Ann. Rev. Immunol., 17, 657 (1999)、日本臨床, 56,

1871 (1998)〕。例えば、 β_3 アドレナリン受容体の64番目のトリプトファンがアルギニンに置換した該変異受容体蛋白質を有する人では、肥満や糖尿病の発症率が高いことが知られている。したがって、本発明のG蛋白質共役型受容体ポリペプチドをコードする遺伝子または該遺伝子の発現制御領域の変異を調べることにより、本発明のポリペプチドの性質や発現量の変化に基づく疾患の発症率や進展速度の予測を行うことができる。

【0223】また、現在使用されている薬剤の多くはGPCRをターゲットとしたものであるが、GPCR遺伝子やGPCR遺伝子の発現制御領域の多型により、GPCRの性質やGPCRの発現量が変化し、薬剤への感受性が変化することが知られている〔Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics, 275, 1274 (1995)、J. Biol. Chem., 272, 1822 (1997)、Pharmacogenetics, 5, 318 (1995)、J. Biol. Chem., 274, 12670 (1999)、Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 95, 9608 (1998)、Science, 286, 487 (1999)〕。したがって、本発明のポリペプチドをコードする遺伝子または該遺伝子の発現制御領域の変異を調べることにより、本発明のポリペプチドの性質や発現量の変化に基づく薬剤の感受性の予測を行うことができる。

【0224】本発明のポリペプチドをコードする遺伝子または該遺伝子の発現制御領域の変異または多型の検出は、該遺伝子または該制御領域の塩基配列情報を用いて行うことができる。具体的には、サザンブロット法、ダイレクトシーケンス法、PCR法、DNAチップ法などを用いて遺伝子の変異や多型を検出することができる〔臨床検査, 42, 1507-1517 (1998)、臨床検査, 42, 1565-1570 (1998)〕。

【0225】本発明のポリペプチドまたはその部分ペプチドをコードするDNA、および本発明のポリペプチドをコードする遺伝子の発現制御領域中の塩基配列を有するDNAを、プローブまたはプライマーとして使用することにより、ヒトまたは哺乳動物(例えば、ラット、ウサギ、ヒツジ、ブタ、ウシ、ネコ、イヌ、サルなど)における本発明のポリペプチドをコードする遺伝子ならびに該遺伝子の発現制御領域の変異や多型を検出することができる。したがって、本発明のポリペプチドまたはその部分ペプチドをコードするDNA、および本発明のポリペプチドをコードする遺伝子の発現制御領域中の塩基配列を有するDNAは、上記変異や多型を検出するための遺伝子診断剤として有用である。

(7-4) 本発明のG蛋白質共役型受容体ポリペプチドの発現量または機能が亢進した疾患の治療剤
アンチセンスRNA/DNA技術〔バイオサイエンスとインダストリー, 50, 322 (1992)、化学, 46, 681 (1991)、Biotechnology, 9, 358 (1992)、Trends in Biotechnology, 10, 87 (1992)、Trends in Biotechnology, 10, 152 (1992)、細胞工学, 16, 1463 (1997)〕、トリ

ブル・ヘリックス技術〔Trends in Biotechnology, 10, 132 (1992)〕、リボザイム技術〔Current Opinion in Chemical Biology, 3, 274 (1999)、FEMS Microbiology Reviews, 23, 257 (1999)、Frontiers in Bioscience, 4, D497 (1999)、Chemistry & Biology, 6, R33 (1999)、Nucleic Acids Research, 26, 5237 (1998)、Trends in Biotechnology, 16, 438 (1998)〕、あるいはデコイDNA法〔Nippon Rinsho - Japanese Journal of Clinical Medicine, 56, 563 (1998)、Circulation Research, 82, 1023 (1998)、Experimental Nephrology, 5, 429 (1997)、Nippon Rinsho - Japanese Journal of Clinical Medicine, 54, 2583 (1996)〕を用いて任意の遺伝子の発現を抑制することができる。

【0226】例えば、上記(2)に記載の本発明のDNA、オリゴヌクレオチドまたはその誘導体を用いて、本発明のポリペプチドをコードするDNAの転写の抑制、あるいは本発明のポリペプチドをコードする転写産物の翻訳の抑制を行うことが可能である。すなわち、本発明のDNA、オリゴヌクレオチドまたはその誘導体を投与することにより、本発明のポリペプチドの生産を抑制することができる。

【0227】例えば、本発明のポリペプチドの発現増加または該ポリペプチドのリガンドの発現増加が原因で受容体を介した生理作用が亢進している患者がいる場合、本発明のDNA、オリゴヌクレオチドまたはその誘導体を患者に投与することにより、該生理作用を抑制することができる。すなわち、本発明のDNA、オリゴヌクレオチドまたはその誘導体は、本発明のポリペプチドの発現量または機能が亢進した疾患の治療剤として有用である。

【0228】本発明のDNA、オリゴヌクレオチドまたはその誘導体を上記治療剤として使用する場合は、本発明のDNA、オリゴヌクレオチドまたはその誘導体を単独あるいはレトロウイルスベクター、アデノウイルスベクター、アデノウイルスアソシエーテッドウイルスベクターなどの適当なベクターに挿入した後、上記(6-5)に記載した常法に従って製剤化、処方および投与することができる。

(7-5) 本発明のG蛋白質共役型受容体ポリペプチドの発現量または機能が低下した疾患の遺伝子予防・治療剤

本発明のポリペプチドをコードするDNAは、本発明のポリペプチドの発現量または機能が低下した疾患の遺伝子予防・治療剤などの医薬として使用することができる。例えば、本発明のポリペプチドの発現低下や変異のためにリガンドの生理作用が期待できない患者がいる場合に、(i) 本発明のポリペプチドをコードするDNAを該患者に投与し発現させることによって、あるいは

(ii) 対象となる細胞に本発明のポリペプチドをコードするDNAを挿入し発現させた後に、該細胞を該患者に

移植することなどによって、患者の体内における本発明のポリペプチドの量を増加させ、リガンドの作用を充分に発揮させることができる。したがって、本発明のポリペプチドをコードするDNAは、本発明のポリペプチドの発現量または機能が低下した疾患に対して安全で低毒性な遺伝子予防・治療剤として有用である。

【0229】本発明のポリペプチドをコードするDNAを上記予防・治療剤として使用する場合は、本発明のDNAを単独あるいはレトロウイルスベクター、アデノウイルスベクター、アデノウイルスアソシエーテッドウイルスベクターなどの適当なベクターに挿入した後、上記(7-4)に記載した常法に従って製剤化、処方および投与することができる。

(7-6) 本発明のG蛋白質共役型受容体ポリペプチドをコードする遺伝子の転写または翻訳を制御する物質のスクリーニング方法

本発明のポリペプチドをコードする遺伝子の転写過程、あるいは転写産物からタンパク質への翻訳過程を促進または抑制する化合物は、該ポリペプチドの発現を制御することにより、該ポリペプチドを介して発揮される細胞機能を制御することが可能である。したがって、本発明のポリペプチドをコードする遺伝子の転写過程、あるいは転写産物からタンパク質への翻訳過程を促進または抑制する化合物は、本発明のポリペプチドに対するリガンドが有する生理活性を増強または抑制することができるので、該リガンドの活性を増強または抑制する安全で低毒性な医薬組成物として有用である。

【0230】該化合物は、以下(a)～(c)に示す方法により取得できる。

(a) [i] 本発明のポリペプチドを発現する細胞と、
[ii] 試験物質の存在下、本発明のポリペプチドを発現する細胞を、上記(4)に記載の培養法で2時間から1週間培養後、細胞中の該ポリペプチド量を、上記(5)に記載した本発明の抗体を用いて測定、比較し、該ポリペプチド量を増加または低下させる活性を有する化合物を選択し取得する方法。

【0231】本発明の抗体を用いた測定法としては、例えば、マイクロタイタープレートを用いるELISA法、蛍光抗体法、ウェスタンブロット法、免疫組織染色等を用いた検出法をあげることができる。

(b) [i] 本発明のポリペプチドを発現する細胞と、
[ii] 試験物質の存在下、本発明のポリペプチドを発現する細胞を、上記(4)に記載の培養法で2時間から1週間培養後、細胞中の該ポリペプチドをコードするDNAの転写産物量を、上記(7-2)に記載したノーザンハイブリダイゼーション法またはPCR法等の方法を用いて測定、比較し、該転写産物量を増加または低下させる活性を有する化合物を選択し取得する方法。

(c) 上記(7-2)で取得したプロモーターの下流にレポーター遺伝子を連結したDNAを組み込んだプラス

ミドを公知の方法により作製し、上記(5)に記載の方法に準じて動物細胞に導入し、形質転換体を取得する。

[i] 該形質転換体と、[ii] 試験物質の存在下、該形質転換体を、上記(5)に記載の培養法で2時間から1週間培養し、細胞中のレポーター遺伝子の発現量を公知の方法〔東京大学医科学研究所 制癌研究部編、新細胞工学実験プロトコル、秀潤社(1993)、Biotechniques, 20, 914 (1996)、J. Antibiotics, 49, 453 (1996)、Trends in Biochemical Sciences, 20, 448 (1995)、細胞工学, 16, 581 (1997)〕を用いて測定、比較し、該発現量を増加または低下させる活性を有する化合物を選択・取得する方法。

【0232】レポーター遺伝子としては、例えば、クロラムフェニコール・アセチルトランスフェラーゼ遺伝子、 β -グルクロニダーゼ遺伝子、 β -ガラクトシダーゼ遺伝子、 β -ラクタマーゼ遺伝子、ルシフェラーゼ遺伝子、エクオリン遺伝子またはグリーン・フルオレセント・プロテイン(GFP)遺伝子等をあげることができる。

(7-7) 本発明のDNAが欠損または置換した動物の作製

本発明のDNAが欠損または置換した動物は、本発明のDNAを含む遺伝子の全部または一部が欠損または置換しており、本発明のポリペプチドの発現量が変化した動物である。該動物、または該動物の臓器、組織または細胞は、上記の方法により取得される医薬、例えば、大腸癌、胃癌または視床、小脳の機能異常等の疾患の治療薬の評価に用いることができ、薬剤評価モデル動物、臓器、組織または細胞として有用である。

【0233】該動物は、本発明のDNAを含むベクターを用い、目的とする動物、例えばウシ、ヒツジ、ヤギ、ブタ、ウマ、ニワトリ、マウス等の非ヒト哺乳動物の胚性幹細胞(embryonic stem cell)において染色体上の本発明のポリペプチドをコードするDNAを公知の相同組換えの手法〔例えば、Nature, 326, 295 (1987)、Cell, 51, 3, 503 (1987)等〕により不活化または任意の配列と置換した変異胚性幹細胞クローンを作成することができる〔Nature, 350, 243 (1991)〕。

【0234】このようにして作成した胚性幹細胞クローンを用い、動物の受精卵の胚盤胞(blastocyst)への注入キメラ法または集合キメラ法等の手法により胚性幹細胞クローンと正常細胞からなるキメラ個体を作成することができる。このキメラ個体と正常個体の掛け合わせにより、全身の細胞の染色体上の本発明のポリペプチドをコードするDNAに任意の変異を有する個体を得ることができ、さらにその個体の掛け合わせにより相同染色体の双方に変異が入った、ホモ個体(ノックアウト動物)を得ることができる。

【0235】このようにして動物個体において、染色体上の本発明のポリペプチドをコードするDNAの任意の

位置へ変異の導入が可能である。例えば染色体上の本発明のポリペプチドをコードするDNAの翻訳領域中への塩基の欠失、置換若しくは付加等の変異を導入することにより、その産物の活性を変化させることができる。

【0236】またその発現制御領域への同様な変異の導入により、発現の程度、時期、組織特異性等を改変させることも可能である。さらにCre-loxP系との組合せにより、より積極的に発現時期、発現部位、発現量等を制御することも可能である。

【0237】このような例としては脳のある特定の領域で発現されるプロモータを利用して、その領域でのみ目的遺伝子を欠失させた例〔Cell, 87, 1317 (1996)〕やCreを発現するアデノウィルスを用いて、目的の時期に、臓器特異的に目的遺伝子を欠失させた例〔Science, 278, 5335 (1997)〕が知られている。

【0238】従って染色体上の本発明のポリペプチドをコードするDNAについてもこのように任意の時期や組織で発現を制御できる、または任意の塩基の欠失、置換若しくは付加をその翻訳領域や、発現制御領域に有する動物個体を作成することが可能である。

【0239】このような動物は任意の時期、任意の程度または任意の部位で、本発明のポリペプチドに起因する種々の疾患、例えば、癌や視床または小脳の機能異常等の症状を誘導することができる。

【0240】従って、本発明のノックアウト動物は、本発明のポリペプチドに起因する種々の疾患、例えば、癌や視床または小脳の機能異常等の治療や予防において極めて有用な動物モデルとなる。特にその治療薬、予防薬、また機能性食品、健康食品等の評価用モデルとして非常に有用である。

【0241】

【実施例】以下の実施例中に記載の方法については、とくに断らない限り、モレキュラー・クローニング第二版記載の方法に従って行った。

実施例1 新規G蛋白質共役型受容体(KAT06734Lポリペプチド)をコードするcDNAのクローニング

(1) KATOIII細胞由来cDNAライブラリーの作製
ヒト胃癌組織細胞株 KATOIIIから、mRNAを抽出し、精製した。それぞれのpolyA(+)RNAよりオリゴキャップ法〔Gene, 138, 171 (1994)〕によりcDNAライブラリーを作成した。Oligo-cap linker (配列番号3で表される塩基配列を有するDNA) およびOligo dT primer (配列番号4で表される塩基配列を有するDNA) を用いて、蛋白質核酸 酵素, 41, 197 (1996)、Gene, 200, 149 (1997) 記載の方法に従ってBAP (Bacterial Alkaline Phosphatase) 処理、TAP (Tobacco Acid Pyrophosphatase) 処理、RNAライゲーション、第一鎖cDNAの合成とRNAの除去を行った。次いで、配列番号5で表される塩基配列を有するDNA (5'末端側) と配列番号6で表される塩基配列を有するDNA (3'末端側) をプライマ

一セットとして用いたPCRにより2本鎖cDNAに変換した後、制限酵素SfiIで切断した。該cDNAをDraIIIで切断したベクター pME18SFL3 (GenBank accession no. AB009864, Expression vector, 3392 bp) に組み込み、cDNAライブラリーを作製した。上記方法により、cDNAは発現が可能なように一方向に組み込まれる。

(2) ランダムシーケンス

上記(1)で調製したcDNAライブラリーの各大腸菌クローンから常法に従ってプラスミドDNAを取得し、各プラスミドが含有するcDNAの5'末端側の塩基配列を決定した。塩基配列の決定は、Dye Terminator Cycle Sequencing FS Ready Reaction Kit, dRhodamine Terminator Cycle Sequencing FS Ready Reaction KitまたはBigDye Terminator Cycle Sequencing FS Ready Reaction Kit(PE Biosystems社製)とDNAシーケンサー・ABI PRISM 377(PE Biosystems社製)を用いて行った。塩基配列決定用のプライマーとしては、配列番号7および8で表される塩基配列を有するDNAを使用した。

【0242】得られた塩基配列についてはBlast、Fast、a、FrameSearch等のプログラムを利用して、相同性のある遺伝子や蛋白質の解析を行った。その結果、pME-KAT06734と名づけたプラスミドが含有するcDNA(KAT06734 cDNAと呼ぶ)は、ヒトソプレッシン受容体やヒト黄体形成ホルモン放出ホルモン受容体と相同性を有する蛋白質をコードしていることがわかった。

(3) KAT06734 cDNAの全塩基配列の決定
上記(2)で得られたpME-KAT06734が含有するcDNA(KAT06734 cDNA)の3'末端側の塩基配列も決定し、該cDNAの全塩基配列を決定した。塩基配列の決定には、パーキンエルマー社のDNAシーケンサー377とApplied Biosystems社製の反応キット(ABI Prism™ BigDye™ Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction kit)を使用した。

【0243】KAT06734 cDNAは880bpで、143アミノ酸からなるポリペプチドをコードしていた(配列番号19)。相同性解析およびハイドロパシー解析から、本cDNAのコードする蛋白質は、C末端を欠失した新規GPCRであると考えられた。

(4) ヒト視床からの完全長cDNA(KAT06734L cDNA)の取得

ヒト胃癌細胞株KATOIIIおよび大腸癌細胞株Colo205由来の全RNAを鋳型として3'-RACE法を行うことにより、KAT06734 cDNAで欠失していた3'末端側のcDNA断片を取得した。3'-RACE法には、5'/3' RACE キット(ペーリンガー社製)を用い、配列番号9で表される塩基配列を有するDNA(図7の06734-5-1)をKAT06734 cDNA特異的プライマーとして用いた。3'-RACE法で取得したcDNA断片の

配列を決定し、KAT06734 cDNAの配列と連結した配列(KAT06734-3')を作成した(図11~13参照)。本配列においては、途中でOpen Reading Frameがずれてしまうことから、再度PCRにより全長cDNAの取得を試みることにした。その際、癌細胞株ではスプライシング異常がある可能性が考えられたため、cDNAソースとしてはヒト正常組織(ヒト視床)を用いた。

【0244】下記の実施例4の方法で調製したヒト視床由来の1本鎖cDNAを鋳型として、配列番号11で表される塩基配列を有するDNA(図7の06734SP5)と配列番号12で表される塩基配列を有するDNA(図10の06734-3-3)をプライマーセットとして用いてPCRを行い、新たなcDNA断片を取得した。PCR反応は、実施例4の(a)で合成したヒト視床由来の一本鎖cDNA(6.25μl)に、Forwardプライマー(配列番号11に記載のDNA)を10pmol、Reverseプライマー(配列番号12に記載のDNA)を10pmol、2.5mmol/L dNTP混合液を2.5μl、5単位/μlのTakara Ex Taq™(Takara社製)を0.1μl、10×反応緩衝液(Takara社製)を2.5μl添加し、滅菌水を加えて全量を25μlに調製した。サーマルサイクラーDNA engine(MJ Research社製)を用い、95℃5分間の熱処理によりDNAを変性させた後、96℃で15秒間、68℃で1分48秒間からなる反応を35サイクル行った。その後、さらに72℃で10分間反応を行った。

【0245】上記PCRで増幅したcDNA断片の配列を、ABI Prism™ BigDye™ Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction Kit(PE Applied Biosystems社製)を用いたダイレクトシーケンスにより決定した。プライマーとしては、配列番号9、11、12で表される塩基配列を有するDNA、および配列番号18で表される塩基配列を有するDNA(図9の06734-3-2)を使用した。決定した塩基配列と、KAT06734 cDNAの5'末端側配列およびKAT06734-3'の3'末端側配列とを連結した配列を作成した(図7~10参照)。本合成配列を有するcDNAをKAT06734L cDNAと呼び、その塩基配列を配列番号2に示す。本cDNAは371アミノ酸の蛋白質をコードしていた(図7~10参照)。該アミノ酸配列を有するポリペプチドをKAT06734Lポリペプチドと呼び、そのアミノ酸配列を配列番号1に示した。

【0246】ハイドロパシープロフィールから、該ポリペプチドは7つの膜結合領域を有すると考えられた(図1)。膜結合領域部分の具体的な予測はEMBO J., 12, 1693(1993)に記載の方法に従って行った。

【0247】該ポリペプチドは、アミノ酸レベルで既知のG蛋白質共役型受容体と相同性を有していたが、中で

もヒトバソプレッシン1A受容体、ヒトバソプレッシン1B受容体、ヒトバソプレッシン2受容体、ヒトオキシトシン受容体、ヒト黄体形成ホルモン放出ホルモン受容体、ホワイツサッカードのバソトシン受容体と高い相同性を示した。KAT06734Lポリペプチドと上記既知G蛋白質共役型受容体のアミノ酸配列を用いて作成したデンドログラムを図14に示す。デンドログラムは、CLUSTAL X Multiple Sequence Alignment Program (<ftp://ftp-igbmc.u-strasbg.fr/pub/ClustalX/>) を用いて作成した。同プログラムを用いて、KAT06734Lポリペプチドと上記既知GPCRのアミノ酸配列をアラインメントした結果を図2~6に示す。KAT06734Lポリペプチド中の予想される7つの膜貫通領域(TM1~TM7)を下線で示してある。

【0248】KAT06734Lポリペプチドはアミノ酸レベルで、ヒトバソプレッシン1A受容体と24.8%、マウスバソプレッシン1A受容体と26.4%、ヒトバソプレッシン1B受容体と27.8%、ヒトバソプレッシン2受容体と22.9%、ヒトオキシトシン受容体と25.6%、ヒト黄体形成ホルモン放出ホルモン受容体と19.0%、ホワイツサッカードのバソトシン受容体と26.7%の相同性を示した。

【0249】以上の結果から、該ポリペプチドは新規なG蛋白質共役型受容体であることが明らかになった。ヒトおよびマウスのバソプレッシン1A受容体、ヒトバソプレッシン1B受容体、ヒトバソプレッシン2受容体、ヒトオキシトシン受容体、ヒト黄体形成ホルモン放出ホルモン受容体、ホワイツサッカードのバソトシン受容体の天然リガンドはいずれもペプチドであることから、該新規G蛋白質共役型受容体のリガンドもペプチドであると推定された。また、該新規G蛋白質共役型受容体は上記既知G蛋白質共役型受容体と19.0~27.8%の相同性を示すことから、該新規G蛋白質共役型受容体のリガンドは、上記既知G蛋白質共役型受容体のリガンドとは異なると推定された。

実施例2 KAT06734Lポリペプチドのヒト培養細胞株における発現

(1) pBS-KAT06734Lの造成

下記の実施例4の方法で調製したヒト視床由来の1本鎖cDNAを鋳型として、配列番号13で表される塩基配列を有するDNA(図7の06734-F)と配列番号14で表される塩基配列を有するDNA(図9の06734-R)をプライマーセットとして用いてPCRを行い、KAT06734LポリペプチドをコードするcDNA断片を取得した。PCR反応は、後述の実施例4の(a)で合成したヒト視床由来の一本鎖cDNA(6.25μl)に、Forwardプライマー(配列番号13で表される塩基配列を有するDNA)を10pmol、Reverseプライマー(配列番号14で表される塩基配列を有するDNA)を10pmol、2.5mmol/L dNTP

混合液を2.5μl、5単位/μlのTakara Ex Taq™(Takara社製)を0.1μl、10×反応緩衝液(Takara社製)を2.5μl添加し、滅菌水を加えて全量を25μlに調製した。サーマルサイクラーDNA engine(MJ Research社製)を用い、95℃で5分間、熱処理によりDNAを変性させた後、94℃で30秒間、65℃で1分間、72℃で2分間からなる反応を1サイクルとして、35サイクル行った。その後、さらに72℃で10分間反応を行った。

10 【0250】該cDNA断片を制限酵素HindIIIとXbaIで切断後、1.1kbのHindIII-XbaI断片を取得した。また、pBluescript II SK(+)を制限酵素HindIIIとXbaIで切断後、3.0kbのHindIII-XbaI断片を取得した。上記2断片を結合することにより、pBS-KAT06734Lを造成した。PCR増幅断片にエラーのないことはシーケンスにより確認した。pBS-KAT06734Lを含む大腸菌であるEscherichia coli DH5α/pBS-KAT06734Lは、平成11年12月8日付で工業技術院生命工学工業技術研究所にFERM BP-6967として寄託されている。

(2) KAT06734Lポリペプチド発現用プラスミドpAMo-KAT06734Lの造成

上記(1)で造成したpBS-KAT06734Lを制限酵素HindIIIとNotIで切断後、1.1kbのHindIII-NotI断片を取得した。また、pAMo〔J. Biol. Chem., 268, 22782 (1993)、別名pAMoPRC3Sc(特開平05-336963)〕を制限酵素HindIIIとNotIで切断後、8.7kbのHindIII-NotI断片を取得した。上記2断片を結合することにより、pAMo-KAT06734Lを造成した。

30 (3) KAT06734Lポリペプチドのヒト培養細胞株における発現

コントロールプラスミド(pAMo)およびKAT06734Lポリペプチド発現用プラスミド(pAMo-KAT06734L)を、それぞれ1μg/μlになるようにTEに溶解した後、エレクトロポレーション法〔Cytotechnology, 3, 133 (1990)〕によりNamalwa KJM-1細胞〔Cytotechnology, 1, 151(1988)〕に導入し、形質転換細胞を得た。

40 【0251】1.6×10⁶細胞あたり4μgのプラスミドを導入した後、8mlのRPMI1640・ITPSG培地〔7.5% NaHCO₃を1/40量、200mmol/L L-グルタミン溶液(GIBCO社製)を3%、ペニシリン・ストレプトマイシン溶液(GIBCO社製、5000 units/ml ペニシリン、5000μg/ml ストレプトマイシン)を0.5%、10mmol/L N-2-ヒドロキシエチルピペラジン-N'-2-エタンスルフォニック・アシッド(N-2-hydroxyethylpiperazine-N'-2-hydroxypropane-3-sulfonic acid; HEPES)、

3 $\mu\text{g/ml}$ インシュリン、5 $\mu\text{g/ml}$ トランスフェリン、5mmol/L ヒルビン酸ナトリウム、125nmol/L 亜セレン酸ナトリウム、1mg/ml ガラクトースを添加したRPMI 1640培地（日水製薬社製）に懸濁し、CO₂インキュベーターで37°Cで24時間培養した。その後、G418（ギブコ社製）を0.5mg/mlになるように添加し、さらに14日間培養して安定形質転換株を取得した。該形質転換株は、0.5mg/mlのG418を含むRPMI 1640・ITPSG培地で継代した。

【0252】該安定形質転換株またはその膜画分は、上記（6-1）に記載した方法に準じて、KAT06734Lポリペプチド（新規G蛋白質受容体）のリガンド、アゴニスト、アンタゴニストまたは機能修飾物質の探索にも利用することができる。

実施例3 KAT06734L染色体遺伝子の構造解析
本発明のKAT06734L cDNAの配列と、データベースに登録されてるヒト染色体遺伝子の配列とを比較することにより、本発明のKAT06734Lポリペプチドをコードするヒト染色体遺伝子（KAT06734L染色体遺伝子と呼ぶ）を同定し、そのプロモーター領域、エクソンおよびイントロン構造を下記の方法により決定した。

【0253】KAT06734L cDNAの塩基配列（配列番号2）とGenBank〔インターネット上のNational Center for Biotechnology Information (NCBI) のホームページ (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) からアクセスできる〕に登録されている配列とを比較した結果、登録番号AC005493、AC005680、AC005174、AC005862、AC005853のヒト染色体DNA配列の一部が、KAT06734L cDNAの塩基配列の一部と一致することが判明した。解析の結果、KAT06734L染色体遺伝子は9個のエクソンと8個のイントロンから構成される非常に大きな遺伝子であることが明らかとなった。AC005493とAC005680の配列はつながり、エクソン1とエクソン2を含んでいた（配列番号15で表される塩基配列を有するDNA）。AC005174、AC005862、およびAC005853の配列はつながり、エクソン3～9を含んでいた（配列番号16で表される塩基配列を有するDNA）。エクソン1の上流配列（1～5kb）は、KAT06734L染色体遺伝子のプロモーター領域（転写制御領域を含む）と考えられた。登録番号AC005680の配列は、ヒト染色体7p14-15に位置することから、KAT06734L染色体遺伝子はヒト染色体7p14-15に位置することが判明した。KAT06734L染色体遺伝子の染色体上の位置と構造（プロモーター領域、エクソン領域、イントロン領域）は、本研究によってKAT06734L cDNAの構造が明らかになることにより、初めて特定できたものである。

【0254】エクソン1の上流配列（5kb）について、配列解析ソフトGENETYX-MAC 10.1のTranscription

Factor Database [Nucleic Acids Research 18, 1749 (1990)、Trends in Biochemical Sciences 16, 455(1991)、Nucleic Acids Research 20S, 2091 (1992)、Nucleic Acids Research 21S, 3117 (1993)] をもとに作成されたMotif Search Programを用いて、転写因子の結合配列のコンセンサス配列の存在について解析した結果、該配列はプロモーター領域を有する配列であると判断された。

【0255】KAT06734L cDNA、KAT06734 cDNA、およびKAT06734L-3'の塩基配列、ならびにKAT06734L染色体遺伝子を比較した結果、KAT06734 cDNAとKATOIII細胞から3'-RACE法で取得したDNA断片は、スプライシングの異常によって生じたバリエーションと考えられた。

実施例4 KAT06734L染色体遺伝子からの転写産物のヒト各種細胞における発現量の検討

KAT06734L染色体遺伝子からの転写産物（KAT06734L転写産物と呼ぶ）の定量は、常法〔PCR Protocols, Academic Press(1990)〕にしたがって半定量的PCR法により行った。

【0256】また、どの細胞でも同程度発現していると考えられる β -アクチンの転写産物の定量も同時に行い、細胞間でのmRNA量の違いや、サンプル間での逆転写酵素によるmRNAから一本鎖cDNAへの変換効率に大差ないことを確認した。

【0257】 β -アクチン転写産物の定量は、常法〔Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 87, 2725 (1990)、J. Biol. Chem., 269, 14730 (1994)、特開平06-181759〕にしたがって定量的PCR法により行った。

(a) 各種細胞および細胞株由来の一本鎖cDNAの合成

ヒト細胞株としては、T細胞株（Jurkat、Molt-3、Molt-4、HUT78）、B細胞株（Namalwa KJM-1、Daudi、Raji）、顆粒球／単球系細胞株（HL-60、U-937、THP-1）、血管内皮細胞株（IVEC、HUVEC）、メラノーマ細胞株（WM266-4、WM115）、神経芽細胞腫細胞株SK-N-MC、肺癌細胞株（PC-9、HLC-1、QG90）、前立腺癌細胞株PC-3、胃癌細胞株KATOIII、膵臓癌細胞株（Capan-1、Capan-2）、大腸癌細胞株（Colo205、SW1116、LS180）を用いた。Jurkat、QG90およびSW1116は愛知癌センターより入手した。HLC-1は大阪大学癌研究所より入手した。KATOIIIおよびPC-9は免疫生物研究所より入手した。HUVEC (human umbilical vascular endothelial cell) はクラボ社より入手した。IVEC [J. Cell. Physiol., 157, 41 (1993)] はN. T. L. FRANCE社より入手した。Molt-4、DaudiはJapanese Collection of Research Bioresources (JCRB) cell bank [インターネットアドレス<http://cellbank.nih.go.jp/>] より入手した。それ以外の細胞は、アメリカン・タイプ・カルチャ

ー・コレクション (American Type Culture Collection) より入手した。

【0258】また、健康な成人の末梢血より Polymorph rep™ (Nycomed Pharma社製) を用いて多形核白血球と単核球を分離取得した。次いで、取得した単核球から NyronFiber (和光純薬社製) を用いてT細胞を取得した。方法はNyron Fiberの説明書に従った。J. Immunol., 150, 1122 (1993)に記載の方法に従って、取得したT細胞を以下の3種の条件で培養し、活性化T細胞を取得した。

①10%FCSを含むRPMI 1640培地を用いて 1×10^6 細胞/mlでシードしたT細胞に、50 ng/mlのインターロイキン2 (IL-2)、1 μ g/mlの phytohemagglutinin-P (PHA-P)、および5 ng/mlのトランスフォーミング・グロース・ファクター β (TGF- β) を添加し、2日間、4日間、6日間、または8日間培養後、細胞を回収した。

②10%FCSを含むRPMI 1640培地を用いて 1×10^6 細胞/mlでシードしたT細胞に、50 ng/mlのIL-2と1 μ g/mlのPHA-Pを添加し、4日間、6日間、または8日間培養後、細胞を回収した。

③抗CD3抗体をコートした培養容器に、10%FCSを含むRPMI 1640培地を用いて 1×10^6 細胞/mlでT細胞をシードし、50 ng/mlのIL-2の存在下、2日間、4日間、6日間、または8日間培養後、細胞を回収した。

【0259】各細胞の全RNAは常法 [Biochemistry, 18, 5294 (1977)] にしたがって調製した。全RNAから一本鎖cDNAの合成はキット (SUPERScript™ Pre-amplification System; BRL社製) を用いて行った。細胞株については5 μ gの全RNAから一本鎖cDNAを合成し、それぞれ水で50倍希釈してPCRの鋳型として使用した。プライマーとしては、オリゴ (dT) プライマーを用いた。

【0260】また、ヒト各種臓器由来のmRNA (Clontech社製) から同様に一本鎖cDNAを合成した。1 μ gのmRNAから一本鎖cDNAを合成し、水で240倍希釈してPCRの鋳型として使用した。プライマーとしては、オリゴ (dT) プライマーを用いた。mRNAとしては、以下の35種類の臓器由来のmRNAを使用した。1副腎、2脳、3尾状核、4海馬、5黒質、6視床、7腎、8脾臓、9脳下垂体、10小腸、11骨髄、12扁桃腺、13小脳、14脳梁、15胎児脳、16胎児腎、17胎児肝臓、18胎児肺、19心臓、20肝臓、21肺、22リンパ節、23乳腺、24胎盤、25前立腺、26唾液腺、27骨格筋、28脊髄、29脾臓、30胃、31精巣、32胸腺、33甲状腺、34気管、35子宮。

(b) 定量的PCR用のスタンダードおよび内部コントロールの調製

pBS-KAT06734LをcDNA部分を切り出す制限酵素HindIIIとNotIで切断して直鎖状DNAに変換した後、酵母のトランスファーRNAを1 μ g/mlで含む水で段階的に希釈して、定量用のスタンダードとして用いた。

【0261】また、 β -アクトンをコードするcDNAを含有するpUC119-ACT、および β -アクトンをコードするcDNAの一部を欠損させたcDNAを含有するpUC119-ACTdのそれぞれのcDNA部分を制限酵素HindIIIとAsp718で切断して直鎖状DNAに変換した後、酵母のトランスファーRNAを1 μ g/mlで含む水で段階的に希釈して、それぞれ β -アクトンの転写産物定量用のスタンダードおよび内部コントロールとして用いた [J. Biol. Chem., 269, 14730 (1994)、特開平06-181759]。

(c) PCR法を用いたKAT06734L転写産物の定量 (a) で調製した各種組織および細胞株由来の一本鎖cDNAを鋳型としてPCRを行った。PCRには、配列番号9 (図7の0634-5') および配列番号17 (図8の06734-3') で表される塩基配列を有するDNAをプライマーセットとして用いた。また、上記(b)で作製したスタンダードを鋳型として同様にPCRを行うことにより検量線を作製した。

【0262】PCR反応は、(a) で合成した一本鎖cDNA (5 μ l) に、Forwardプライマー (配列番号9に記載のDNA) を10 pmol、Reverseプライマー (配列番号17に記載のDNA) を10 pmol、2.5 mmol/L dNTP混合液を1.6 μ l、ジメチルスルフォキシドを1 μ l、5単位/ μ lのRecombinant Taq DNA Polymerase (Takara社製) を0.1 μ l、10 \times 反応緩衝液 (Takara社製) を2 μ l添加し、滅菌水を加えて全量を20 μ lに調製した。サーマルサイクラーDNA engine (MJ Research社製) を用い、94 $^{\circ}$ Cで3分間の熱処理によりDNAを変性させ後、94 $^{\circ}$ Cで1分間、60 $^{\circ}$ Cで1分間、72 $^{\circ}$ Cで1分間からなる反応を1サイクルとして25~35サイクル行った。該反応液の一部 (8 μ l) をアガロースゲル電気泳動に供した後、ゲルをSYBR Green I nucleic acid stain (Molecular Probes社) で染色した。増幅されたDNA断片のパターンをフルオロイメージャー (FluorImager SI; Molecular Dynamics社製) で解析することにより、増幅されたDNA断片の量を測定した。より正確な転写産物の定量を行なうため、PCRのサイクル数を変えて同様のPCRを行った。スタンダードの量はPCRのサイクル数に応じて変化させた。

【0263】 β -アクトンの転写産物の定量については J. Biol. Chem., 269, 14730 (1994) および特開平06-181759に記載の方法と同様に行った。

【0264】KAT06734L転写産物は、ヒト正常組織では視床と小脳で比較的多く発現していた。全脳、

海馬、黒質、胎児脳、胎児腎、胎児肝臓、心臓、肝臓、乳腺、胎盤、前立腺、唾液腺、骨格筋、胸腺、甲状腺、子宮でも発現が見られた(図15)。KAT06734 Lポリペプチドは、上記発現組織において重要な生理学的機能を果たしていると推定される。

【0265】ヒト培養細胞株では、大腸癌細胞株(LS-180、Colo205)および胃癌細胞株(KATOIII)でKAT06734 L転写産物の発現がみられた。その他の細胞株では発現はみられなかった(図16)。KAT06734 L転写産物が発現している上記細胞株は、上記(6-1)に記載した方法に準じてKAT06734 Lポリペプチドのリガンド、アゴニスト、アンタゴニストまたは機能修飾物質の探索に利用することができる。

【0266】

【配列表フリーテキスト】

配列番号3-人工配列の説明：合成DNA

*

SEQUENCE LISTING

<110> KYOWA HAKKO KOGYO CO., LTD

<120> Novel Polypeptides

<130> H11-1931A4

<140>

<141>

<160> 18

<170> PatentIn Ver. 2.0

<210> 1

<211> 371

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 1

Met Pro Ala Asn Phe Thr Glu Gly Ser Phe Asp Ser Ser Gly Thr Gly

1

5

10

15

Gln Thr Leu Asp Ser Ser Pro Val Ala Cys Thr Glu Thr Val Thr Phe

20

25

30

Thr Glu Val Val Glu Gly Lys Glu Trp Gly Ser Phe Tyr Tyr Ser Phe

35

40

45

Lys Thr Glu Gln Leu Ile Thr Leu Trp Val Leu Phe Val Phe Thr Ile

50

55

60

Val Gly Asn Ser Val Val Leu Phe Ser Thr Trp Arg Arg Lys Lys Lys

65

70

75

80

Ser Arg Met Thr Phe Phe Val Thr Gln Leu Ala Ile Thr Asp Ser Phe

85

90

95

Thr Gly Leu Val Asn Ile Leu Thr Asp Ile Asn Trp Arg Phe Thr Gly

100

105

110

Asp Phe Thr Ala Pro Asp Leu Val Cys Arg Val Val Arg Tyr Leu Gln

115

120

125

Val Val Leu Leu Tyr Ala Ser Thr Tyr Val Leu Val Ser Leu Ser Ile

130

135

140

Asp Arg Tyr His Ala Ile Val Tyr Pro Met Lys Phe Leu Gln Gly Glu

*配列番号4-人工配列の説明：合成DNA

配列番号5-人工配列の説明：合成DNA

配列番号6-人工配列の説明：合成DNA

配列番号7-人工配列の説明：合成DNA

配列番号8-人工配列の説明：合成DNA

配列番号9-人工配列の説明：合成DNA

配列番号10-人工配列の説明：合成DNA

配列番号11-人工配列の説明：合成DNA

配列番号12-人工配列の説明：合成DNA

10 配列番号13-人工配列の説明：合成DNA

配列番号14-人工配列の説明：合成DNA

配列番号17-人工配列の説明：合成DNA

配列番号18-人工配列の説明：合成DNA

【0267】

【配列表】

77 78
 145 150 155 160
 Lys Gln Ala Arg Val Leu Ile Val Ile Ala Trp Ser Leu Ser Phe Leu
 165 170 175
 Phe Ser Ile Pro Thr Leu Ile Ile Phe Gly Lys Arg Thr Leu Ser Asn
 180 185 190
 Gly Glu Val Gln Cys Trp Ala Leu Trp Pro Asp Asp Ser Tyr Trp Thr
 195 200 205
 Pro Tyr Met Thr Ile Val Ala Phe Leu Val Tyr Phe Ile Pro Leu Thr
 210 215 220
 Ile Ile Ser Ile Met Tyr Gly Ile Val Ile Arg Thr Ile Trp Ile Lys
 225 230 235 240
 Ser Lys Thr Tyr Glu Thr Val Ile Ser Asn Cys Ser Asp Gly Lys Leu
 245 250 255
 Cys Ser Ser Tyr Asn Arg Gly Leu Ile Ser Lys Ala Lys Ile Lys Ala
 260 265 270
 Ile Lys Tyr Ser Ile Ile Ile Ile Leu Ala Phe Ile Cys Cys Trp Ser
 275 280 285
 Pro Tyr Phe Leu Phe Asp Ile Leu Asp Asn Phe Asn Leu Leu Pro Asp
 290 295 300
 Thr Gln Glu Arg Phe Tyr Ala Ser Val Ile Ile Gln Asn Leu Pro Ala
 305 310 315 320
 Leu Asn Ser Ala Ile Asn Pro Leu Ile Tyr Cys Val Phe Ser Ser Ser
 325 330 335
 Ile Ser Phe Pro Cys Arg Glu Gln Arg Ser Gln Asp Ser Arg Met Thr
 340 345 350
 Phe Arg Glu Arg Thr Glu Arg His Glu Met Gln Ile Leu Ser Lys Pro
 355 360 365
 Glu Phe Ile
 370

<210> 2

<211> 1714

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 2

agcacgtaga tcctccctgt catcaggcag agctcttcag tgagggtggc tcaggaggagg 60
 ctctgtgcct ccgttcagca gagctgcagc tgctgccag ctctcaggag gcaagctgga 120
 ctcctcaact cggtgcagg agcaaggaca gtgaggetca accccgctg agcc atg 177

Met

1

cca gcc aac ttc aca gag ggc agc ttc gat tcc agt ggg acc ggg cag 225
 Pro Ala Asn Phe Thr Glu Gly Ser Phe Asp Ser Ser Gly Thr Gly Gln

5

10

15

acg ctg gat tct tcc cca gtg gct tgc act gaa aca gtg act ttt act 273
 Thr Leu Asp Ser Ser Pro Val Ala Cys Thr Glu Thr Val Thr Phe Thr

20

25

30

gaa gtg gtg gaa gga aag gaa tgg ggt tcc ttc tac tac tcc ttt aag 321
 Glu Val Val Glu Gly Lys Glu Trp Gly Ser Phe Tyr Tyr Ser Phe Lys

35

40

45

79	80	
act gag caa ttg ata act ctg tgg gtc ctc ttt gtt ttt acc att gtt	369	
Thr Glu Gln Leu Ile Thr Leu Trp Val Leu Phe Val Phe Thr Ile Val		
50	55	60
65		
gga aac tcc gtt gtg ctt ttt tcc aca tgg agg aga aag aag aag tca	417	
Gly Asn Ser Val Val Leu Phe Ser Thr Trp Arg Arg Lys Lys Lys Ser		
70	75	80
aga atg acc ttc ttt gtg act cag ctg gcc atc aca gat tct ttc aca	465	
Arg Met Thr Phe Phe Val Thr Gln Leu Ala Ile Thr Asp Ser Phe Thr		
85	90	95
gga ctg gtc aac atc ttg aca gat att aat tgg cga ttc act gga gac	513	
Gly Leu Val Asn Ile Leu Thr Asp Ile Asn Trp Arg Phe Thr Gly Asp		
100	105	110
ttc acg gca cct gac ctg gtt tgc cga gtg gtc cgc tat ttg cag gtt	561	
Phe Thr Ala Pro Asp Leu Val Cys Arg Val Val Arg Tyr Leu Gln Val		
115	120	125
gtg ctg ctc tac gcc tct acc tac gtc ctg gtg tcc ctc agc ata gac	609	
Val Leu Leu Tyr Ala Ser Thr Tyr Val Leu Val Ser Leu Ser Ile Asp		
130	135	140
145		
aga tac cat gcc atc gtc tac ccc atg aag ttc ctt caa gga gaa aag	657	
Arg Tyr His Ala Ile Val Tyr Pro Met Lys Phe Leu Gln Gly Glu Lys		
150	155	160
caa gcc agg gtc ctc att gtg atc gcc tgg agc ctg tct ttt ctg ttc	705	
Gln Ala Arg Val Leu Ile Val Ile Ala Trp Ser Leu Ser Phe Leu Phe		
165	170	175
tcc att ccc acc ctg atc ata ttt ggg aag agg aca ctg tcc aac ggt	753	
Ser Ile Pro Thr Leu Ile Ile Phe Gly Lys Arg Thr Leu Ser Asn Gly		
180	185	190
gaa gtg cag tgc tgg gcc ctg tgg cct gac gac tcc tac tgg acc cca	801	
Glu Val Gln Cys Trp Ala Leu Trp Pro Asp Asp Ser Tyr Trp Thr Pro		
195	200	205
tac atg acc atc gtg gcc ttc ctg gtg tac ttc atc cct ctg aca atc	849	
Tyr Met Thr Ile Val Ala Phe Leu Val Tyr Phe Ile Pro Leu Thr Ile		
210	215	220
225		
atc agc atc atg tat ggc att gtg atc cga act att tgg att aaa agc	897	
Ile Ser Ile Met Tyr Gly Ile Val Ile Arg Thr Ile Trp Ile Lys Ser		
230	235	240
aaa acc tac gaa aca gtg att tcc aac tgc tca gat ggg aaa ctg tgc	945	
Lys Thr Tyr Glu Thr Val Ile Ser Asn Cys Ser Asp Gly Lys Leu Cys		
245	250	255
agc agc tat aac cga gga ctc atc tca aag gca aaa atc aag gct atc	993	
Ser Ser Tyr Asn Arg Gly Leu Ile Ser Lys Ala Lys Ile Lys Ala Ile		
260	265	270
aag tat agc atc atc atc att ctt gcc ttc atc tgc tgt tgg agt cca	1041	
Lys Tyr Ser Ile Ile Ile Ile Leu Ala Phe Ile Cys Cys Trp Ser Pro		
275	280	285
tac ttc ctg ttt gac att ttg gac aat ttc aac ctc ctt cca gac acc	1089	
Tyr Phe Leu Phe Asp Ile Leu Asp Asn Phe Asn Leu Leu Pro Asp Thr		
290	295	300
305		

81 82
 cag gag cgt ttc tat gcc tct gtg atc att cag aac ctg cca gca ttg 1137
 Gln Glu Arg Phe Tyr Ala Ser Val Ile Ile Gln Asn Leu Pro Ala Leu
 310 315 320
 aat agt gcc atc aac ccc ctc atc tac tgt gtc ttc agc agc tcc atc 1185
 Asn Ser Ala Ile Asn Pro Leu Ile Tyr Cys Val Phe Ser Ser Ser Ile
 325 330 335
 tct ttc ccc tgc agg gag caa aga tca cag gat tcc aga atg acg ttc 1233
 Ser Phe Pro Cys Arg Glu Gln Arg Ser Gln Asp Ser Arg Met Thr Phe
 340 345 350
 cgg gag aga act gag agg cat gag atg cag att ctg tcc aag cca gaa 1281
 Arg Glu Arg Thr Glu Arg His Glu Met Gln Ile Leu Ser Lys Pro Glu
 355 360 365
 ttc atc tagaccctag ggcagtgcca gtgctaggct gagcaccatc agctctccca 1337
 Phe Ile
 370
 ggtccttgtc acctgcttgg gcacgtgcat ggaacccgag ccaacttcac cccaccctcg 1397
 tcattacctg ggagatgcac aagacaaatg ttctaatac tgcattgact gcttaagtat 1457
 tggccaacac gaactcccca gttattcatg ccagccagga aggaaacgcc ttccttcccc 1517
 accattccca gccctccttc ccaactggcca gcacctgaac ccagtgaaca caggcatcag 1577
 tggtcagggg tcttgcttg gagccagtga gtagacaggc aagcagaggg gacaaaaggta 1637
 gctgggttat acatgaatat tctcattaca ataggagaaa ataaaagact taattaagcc 1697
 caaaaaaaaa aaaaaaa 1714

<210> 3
 <211> 30
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220>
 <223> Description of Artificial Sequence: synthetic DNA
 <400> 3
 agcaucgagu cggccuuguu ggccuacugg 30

<210> 4
 <211> 42
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220>
 <223> Description of Artificial Sequence: synthetic DNA
 <400> 4
 ggggctgaag acggcctatg tggccttttt tttttttttt tt 42

<210> 5
 <211> 21
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220>
 <223> Description of Artificial Sequence: synthetic DNA

83

84

<400> 5

agcatcgagt cggccttggt g

21

<210> 6

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: synthetic DNA

<400> 6

gcggctgaag acggcctatg t

21

<210> 7

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: synthetic DNA

<400> 7

cttctgctct aaaagctgcg

20

<210> 8

<211> 30

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: synthetic DNA

<400> 8

tgtgggaggt ttttctcta

20

<210> 9

<211> 23

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: synthetic DNA

<400> 9

agagggcagc ttcgattcca gtg

23

<210> 10

<211> 24

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

85

86

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: synthetic DNA

<400> 10

gaatggggtt cttctacta ctcc

24

<210> 11

<211> 22

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: synthetic DNA

<400> 11

ggctgcagga gcaaggacag tg

22

<210> 12

<211> 23

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: synthetic DNA

<400> 12

aaccagcta ctttgtccc etc

23

<210> 13

<211> 33

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: synthetic DNA

<400> 13

tgacaagctt acccgcctg agccatgcc gcc

33

<210> 14

<211> 33

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: synthetic DNA

<400> 14

tagtgcgcc gctggcactg ccctagggtc tag

33

<210> 15

<211> 80578

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<220>

<221> exon

<222> (25203)..(25523)

<220>

<221> exon

<222> (51516)..(51648)

<400> 15

gatctttgac aaacctgaca aaaacaagaa atggggaaag gattccctat ttaataaatg 60
gtgctgggaa aactggctag ccatatgtag aaagctgaaa ctggatccct tccttacacc 120
ttatataaaa attaatccaa gatggattaa agacttaaac gttagacctt aaaccataaa 180
aacccctagaa gaaaatctag gcaataccat tcaggacata ggcatgggca aggacttcat 240
gtctaaaaca ccaaaagcaa tggcaacaaa agccaaaatt gacaaatggg atctaataca 300
actaaagagc ttctgcacag caaaagaaac taccatcaga gtgaacaggc aacctacaga 360
atgggagaaa agttttgcaa tctactcatc tgacaaaggg ctaatatcca gaatctacaa 420
tgaactccaa caaatctaca agaaaaaac aaacaacccc atcaacaagt gggcaaaagga 480
catgaacaga cacttctcaa aagaagacat ttatgcagcc aaaagacaca tgaaaaaatg 540
ctcatcatca atggccatca aagaaatgca aatcaaaact acaatgagat accatctcac 600
accagttaga atggcaatca ttaaaaagtc aggaacaac aggtgctgga gaggatgtgg 660
agaaatagga acacttttac actgttgggt ggactgtaaa ctagttcaac cattgtggaa 720
gtcagtgtgg cgattctca gggatctaga actagaaata ccatttgacc cagcaatccc 780

attactgggt atacacccaa aggattataa atcaagctgc tataaagaca catgcacatg 840
tatgtttatt gtggcactat tcacgatagc aaagacttgg acccaaccca aatctccaac 900
aatggtagac tggattaaga aaatgtggtt catatacacc atggaatact atgcagccat 960
aaaaaatgat gagttcatgc cttttgtagg gacacggatg aagatggaaa ccatcactct 1020
cagcaaaacta tcgcaaggac aaaaatccaa acactgtatg ttctcactca taggtgggaa 1080
ttgaacaatg agaacacatg gacacaggaa ggggaacatc acacacaggg gcctgtttgt 1140
gggtgtgggg aggtggggag gtagatcatt tggagatata cctaattgta aatgacgagt 1200
tactgggtgc agcacaccaa catggcatat gtatacatat gtaactaacc tgcacattgt 1260
gcacatgtac cctaaaactt aaagtataat aaataacaaa aaaaaaaaaa gaaaaggaa 1320
aaacaaatcc tctgagaaat atagaactat gtgaaaagac caaatctacg tttgatgggt 1380
gtacctgaaa gtgatgggga gaatggaacc aagttggaac acattcttca ggatatgatc 1440
caggagaact tcccaacct actaagacag gccaatatc aaattcagga agtacatgga 1500
acaccacaaa gatactctc gagaagagca accccaaaac acataatcat cagattcacc 1560
aagtttgaaa tgaaggaaaa aatattaaca gcagctagag agaaagggtcg ggttaccac 1620
aaaaggagc ctatcagact aacagtggat ctctctgcag aaacctaca agccagaaga 1680

gagtaggggc caatattcaa cattcttaaa gaaaataatt ttcaaccag aatttcatat 1740
ccagtcatac taagcttcat aagcaaaagga gaaacaaaat cctttacaga caagcaaatg 1800
ctgagagatt ttgtcaccac cagacctgac ttaaaagagc tcctgaagga agcactaaat 1860
atgaaaagga aaaaccata ctagccactg caaaacata ccaattgta aagaccatca 1920
acactatgaa gaaactgcat caactaatga gcaaaataac cagctagcat cacaatgaca 1980
ggatcaaatt cacactaaca atattaacct caaatgtaaa caaactaaat gccccaatta 2040
aaagacacag actggcaaat tggataagca gtgaagaacc actggtgtgc tgtattcagg 2100
agacctatct cacagacaaa gacatacaca ggctcaaaat gaaggatgg aggagaattt 2160
accaagaaaa tggaaagcaa aaaaaagcag gggttgcaat cctagtctct gataaacag 2220
actttaaac aacaaagatc aaaaaagaca aagaagagca ttacataatg gtaagggtat 2280
caaagcaaca agaagagcta actatcctaa atatatatgc acccaataca ggagcaccca 2340
gattcataaa gcaagttctt agagaactac aaagagactt agaattctac acaataatag 2400
tgggagactt taacaaccca ctgtcaatat tagacagatc aacaagacag aaaattaaca 2460

aggatattca ggacttgaac tcagctctgg attgagcaga cctaatagac atctccaccc 2520

caaattaaca gaatatacct tcttctcage acctcatggc acttattcta aaattgacca 2580
cataattgga agtgaaacac tcctcagcaa atgcaaaaaga acggaaatca taacagtctc 2640
tcagaccaca gtgcaatcaa attagaaccc aagattaaga aactcattca aaactgcaca 2700
accacaagga aactgaacaa cctgcccctg aatgactact gggtacataa tgaaatcaag 2760
gcagaaataa ataagttctt tgaaccaat gagaacaaag acacagtgtg ccagaatctc 2820
tgggacacag cttaaagcagt gtttagagga aaatttatag cactaaatgc ccacaggaga 2880
aagtagaaaa gatctaaaat caacacccta acatcagaat taaaagaact agagaagcaa 2940
gggcaaaaga attcaaaagc tagcagaagg caagaaataa ctaagatcag agcagaactg 3000
aaggagatag agacatgaaa aacccttaaa aatatcaacg aaccacaggag ctggtgtttt 3060
gaaaagatta acaaaataga tagaccgcta gccagactaa taaagaagaa aatagagaaa 3120
aatcaaatag acacaataaa aaatgataaa gggataccat cactgatccc acagaaagac 3180
aaaccaccat cagagaatac tataaacatc tctatgcaa taaactagaa catctagaag 3240
aaatggataa attcctggac acatacacac tcccaagacc aaaccaggaa gaagttgatc 3300
cctgaataga ccagtaacaa gttctgaaat tgaggcagta attaatagcc taccaaccaa 3360
aaaaaccaca ggaccagatg gattcactgc caaattctac cagaggtaca aagaggagct 3420

ggtactattc cttctgaaat ttttccaaac aacaaaaaaa gagggactcc tccctaacte 3480
attttaagag accagcatca tcctgatact aaaacctggc agagacacaa caaaaaaga 3540
aatttttaggc caatatccct gatgaacatc aatgtgaaaa tcctcaataa aatactggca 3600
aaccaaatcc agcagcacat caaatagctt atccaccaca atcaagttgg cttcatacct 3660
gggctgcaag gctagttaa cttatggaaa tcaataaacg taatccatca cataaacaga 3720
accaatgaca gaaaccacat gattatctca atagatgcag aaaaggcctt tgacaaaatt 3780
caacaccctc tcagtctaaa aactctcaat aaactaggtg ttgatggaa atacttcaaa 3840
ataataagag ctattttatg caaaccacaa gccagtatca cactgaacgg gcaaaaagctg 3900
gaagcattcc ctttgaaaac cagcacaaga caaggatgcc ctctctctcc actcctattc 3960
aacatagaat tggaagtctt ggccagggca atcaggcaag agaaagaaat aaagcgtatt 4020
caaaaagaaa ggaatccaa ctgtctctgt ttgcagatga catgactgta tacctagaaa 4080
acccattgt ctcagcccaa aatctccttc agctgataag caacttcage caagtctcag 4140
gatacaaaat caatgtgcaa aaatcagaag aattcctatg caccaatcat acacaaaaag 4200
agagaaagat tatgagtga ctccattca caatggctac aagagaataa atacctagga 4260

atccaactta cttacaaggg atgtgaagga cctcttcaag aactacaaac cactgctcaa 4320
ggaaaataaa gaggacacaa acacatggaa aaacattcca tgctcatgga taggaagaat 4380
caatatcgtg aaaaatggcca tactgcccac agtaatttag agattcaatg ctatcccat 4440
caagctacca ttaactttct tcacagaatt agaaaaaac tactttaaat ttgatacgga 4500
accaaaaatg aggtgtata gccaaagaaa tcctaagcaa aaataacaaa gctggaggca 4560
tcacactacc tgacttcaaa ctatactaca aacagcatgg tactggtacc aagacagata 4620
tatagaccaa tggaacagaa cagaggcctc agaaataatg acatatatct acaatcatct 4680
gatctttgac aaacctgaca aaacaagcaa tgaggaaagg attccctgtt taataaatgg 4740
tgctgggcaa actggctagc catatgcaaa aaacacagaa actggacccc ttccttacac 4800
cttatacaaa aattaagcca agatggatta aagacttaag tgtaagacct aaagccataa 4860
aaacctaga agaaaacctg ggcaatacca ttcaggacat aggcattggc aaagacttca 4920
tgactaaaac accaaaagca aaggcaacaa aagccaaaat tgacaaatgg gatctaatta 4980
aactaaagag cttctgcaca gcaaaataaa ctatcatcag agtaaacagg caacctacag 5040
aatgggaaaa aaattttgca aactattcat ctgaaaaagg gctaatatcc agaacttaca 5100
aagaacttaa agaaatttac aagaaaaaaa atcccatcaa aaagtgggtg aaggatatga 5160

atagacactt ctcaaaagaa gatatttatg tggtaaaaa acatatgaaa aaaagctcat 5220

catcactggt cattagagaa atgcagatca aaaccacaat gagataccgt ctcatgccag 5280
 ttagaatggc gatcattaca aagtcaggaa acaacagatg ctggagagga tgtggagaaa 5340
 taggaaagct tttacactac tgggtgggagt gtaaattagt tcaaccattg tggagacag 5400
 tgtggcgatt cctcaaggat ctagaaccag aaataccatt tgaccagacc atcccattac 5460
 tgggtatata cccaaaggat tataaatcat tctactataa agatgcatgc atacgtaggt 5520
 ttattgcagc actagtcaca atagtaaaca cttggaacca acccaaagtc ccatcagtaa 5580
 tagactggat aaagcaaatg .tggcacatat acaccatggg atactatgca cctataaaaa 5640
 aggatgggtt catgtccttt gcagggatgt gaatgaagct ggaaaccatc attctcagca 5700
 aactaacaca gaaacagaaa accaaacact gcatgttctc actcataagt gggagttgaa 5760
 caatgagaac agatggacac agggaggaca tcacacacca tggcctgcca gggggttaga 5820
 ggctagggga gagatagcat tcaagaaata cctaattgag atgacagggt gatgggtgca 5880
 gcaaaccaac atggcatgtc catacctatg taacaaacct gcacattctg cacatgtatc 5940
 ccagaactta aagtataatt ttaaaaaagt aggttggaga ttcataatta aagtgaact 6000

aagccaaaat ttgtattatt tttcttaata atttccaaa tgcaatctaa gttttacctt 6060
 ttaagccaat ctgatcaact tctcatggca ctaccttgag aaaaactcta aggtatacta 6120
 agacacagtg gttctcagtg ccataatcca tcagtgaatg tggggacagg cagcaggcac 6180
 agagagtggg gagtgtgccc agctctgaca taaagaacaa caatatgttg atgcaacatc 6240
 aagaagtgc ttctctctg ggttctctg tagccgttat cagctattac ccaactcagc 6300
 tactctacag tcattttcaa cacttttctt ctttctgtg tcccattgcc aagtctttaa 6360
 aagccaggca ctcatttttc aagaccctt tcataaggcc aggggttgct gtataaccta 6420
 gttattgcca gtaggatgta aagagataat tgcacatc tcataagca tcatgaaaat 6480
 attttcctct ctgaacagag aaacagatga agaagaatgt ctctctctac caccagcatc 6540
 ctccccacc ctccgacctt tttgttggtt gttgattttt gtttctgtt tgagacggag 6600
 tctcgtctg tcgcccaggc tggagtgcag tggcgcaatc ttggctcact gcaacctctg 6660
 cctcccaggt tcaagcgatt ctctgcctc agcctccga gtagttggga ttacaggcac 6720
 cctgccccca cgctgggcta atttttgtat ttttagtaga gatgaggttt caccatgttg 6780
 gccaggttgg tctcctaacc tcaagtgtc ctcttaacct caagtgtct gctgtcttg 6840
 gcctcccaaa gtgctgggat tatatgcatg agccaccag cctagcctcc tccccgctt 6900

tttttaaac cattaccatc cttgctttct gatttggact ggcattgaag atatgattat 6960
 taggaatctg actgccaact tgtgatcgtg aaggaagaca ttggcaacat gataaaaata 7020
 gcatagagga ggatgaaagg agtctggatg tcctggggac ttgttgagct accaaacca 7080
 cctgatact gccagcttc tgttcttgtt ggtataaaca atacatggct tggcggtttc 7140
 atctactgtg agttaagtct tctgctcctt gctatcgagt gtatcctaaa accaatacac 7200
 cagcaaatga gatgcaagaa taactgcctg tttgctctgt catttttgca atgtagacac 7260
 cacctagaac aagaaaatta ctgaatctct gaatgacatt tttgtaaage catagaagca 7320
 aaaacacaag tttaaaagac ctgattttta attattagag tcagattctt gagaaaattt 7380
 ctgatggcct tgaagccagc agtttatata gtgaggcagg acaaggagaa atctatttga 7440
 gtgtgtttc ctccccgcac acagataaaa tcagaacatt ttctagagag gattgggaat 7500
 ggagaagaca gcagatgcta atgttgggct ctgcttcctg gctttccctt cctacagggt 7560
 tgaccttg atgggtgga taaaataggc ttggagatct gaatgtaga aggacttgc 7620
 ccacacttcc tgctcgaac tcagagagga gatggccttc aagaatgcct tgcagcaacg 7680
 tgggtagaca gcattgggct cagaataggc gcacagcata gcaaaaccaa ctcactctcag 7740

gtcttggag agacttcaaa aagctccaa gttccccca aaaaggagct caaaggacag 7800
 cagagaatga agagctggaa tgcacagga attcacatcc gcataatcaga gactcagaaa 7860
 gtgattatgt cagataaatg gaagaaaaat aagtagaaag agaattcttc aggagacta 7920
 aattttaaaa taaattactc tgaatgaga agttaagagt cttttgggtc ttgtccata 7980
 tagaacaaaa gagctatgtt aatttatctt gtaaagaaag ttttgtttca tgcacccag 8040

93

94

ttgataatgt aaaattttaa gttgcttcag ataatgtgac aaccttgagg tataatacat 8100
 taggactcat ctctctgaac gaacagcaac tttgcaaaag aggaacggg gctgctgtt 8160
 ctgttactgt cacatctgat ttttatttgt atatgacttg accagccttt atagctctca 8220
 ccacacagca ctccatgtt ccataatgga cctgttcaaa ggaagccata tccctccact 8280
 tgatttgctt ctgataccag ttccaggggt attgatctgt cttgagtaat gtgttattgt 8340
 tgacagagag gtttcttgac tccctgtagg tgacttttta tgccctttaa agttctgaaa 8400
 agcccataaa gataatgttt aaattacaag tcatacaciaa cagaagagag tctggagcag 8460
 ccacacaggc aactgcatag taccagaagg actgtggaca tggaatcaga ctacacagtt 8520
 ccatagctga ctgggtatat tactctttcc tcaatttcct catatgtgaa atggtaaggc 8580
 taatatctac ctacataggt tttctgaaga ttttataaga gatcacatat ataaagcacc 8640

taaccttggt aatccataga agaaatgtaa taaatctcag aaaaagaaga gatttttttt 8700
 ctcccttctt ttgttatttc atgctataaa ttttaccatt ttctgggttt aagtacaatg 8760
 cgtttatgct aaggtttaac acgggtggctt catcttttag tcattctaat taatttcagc 8820
 attgactgaa cccagtgccc cctgtagata aaaacaggac caaccactaa acattaaact 8880
 ctcaagcacc cactgttaac cacttaaaaca gctagagggt gctccactga tacttattaa 8940
 acagatgttc actctgtaac aaaagtgtac caatctcacc ctgaagccca gaaaatagaa 9000
 aagaagatag gacagcctct gttaccaatg gcagaaatat gacagggtta tatgaggcta 9060
 agataaagga tatcaaaact aaaaccaaga gtgataagca aggagactgt gttagactgt 9120
 ttcaataatt aaggtagaaa atgatggcag cctgaagtgt gattttcatg atggagatgg 9180
 ggagaaatag atagttttaa aactgtttaa aaggagcatt ggcagaactc attaatgaa 9240
 cagatgcaga tagcaggtag gctgggggag ggagggttta catatgacaa catgacatat 9300
 tctgttaata ctaattgaag gcctctatgg' tggaaactact tacttaggtg acttgggaat 9360
 acaggggagt aaagtcacat tccctgctcc caagaaatgt atagtacatt taaagggata 9420
 agacataaca acatcttttt agtatctgt ctagtattt attttatttt ttagggccct 9480

attctgttct caaaaaaaaa aaaaaaaaa gtagtaagga tgaaaagggg tagggcatct 9540
 ggaaaaaact ttggagaagc ctcaggaaca tcccgttga aacctccagc caattatttc 9600
 agtcttatag agagagtga ttaaatgaat aggttggtgc actatttttg agaagcctga 9660
 gtgcctcttc taagagctat tctcatttcc acaaaaagga agggaaattg cggatatcaa 9720
 aagtagtggt tgaaagtcac ttcttaagaa ttatatcgag tcaaaacact ttcattttaa 9780
 gcccttaata tttgaacatt gttatttatt ttgtctgttt ggatttttat gtgtgtgttt 9840
 gtgtacctat gaaaaactat tcatgtctca aatgaaataa aagaagggtg ctgtgatgta 9900
 ttagtatagg ttctcaattt ctgtcctagg taagatgaaa agcatgaaga tgcctcttc 9960
 aatcccgta tggccacagt ctcccttgta taccatata ggctctacct caagttgtgg 10020
 gcaaaacttct ttaccacact gtcatgaac tgtgcttttt ctatgctatc tctagggccc 10080
 caagactgta tggatagctg cagaccacca cattcaggaa gaggggcccag atccattagg 10140
 gagtataatt ggcattgagc tgatagagaa taaaggagaa aaacttctg agtagctcca 10200
 gtcttaccaa cccagcttct gtttcaaagt gagttcatga tcaacgggtg tctgcctgg 10260
 agtcattagt ccagagaaca tcccaacaaa gaagggttag gaagttttcc taaacctaat 10320
 ttttaggtca aaaaaacaag acagagagag aacaagatta ggaaataaat gggaagttgg 10380

aggagccgg atcaagcaga agtaagccca agaatgcaag ggaaaggtct gaggtataat 10440
 ggtataggtc tgagacagga agagctacgg aataagcaga gcaagaaagt gcagagggca 10500
 ataaggaatc ctttcagatg cttttcttct actccaacce caattagata cacatgggca 10560
 ttggttaatt tgccttctga atctctggga taatacatca accagctcat ttgcctggg 10620
 gagagggtct ttgaaattag cacaatagct ctgatttctt gccaaatggt taatcagaag 10680
 gggacctaat acataaagag caggaatcta ttgttttcat agactcctta tgccttgggt 10740
 aagacataat tctaacttgc tattaccccc ttctctgatt ttacactaac tagggatata 10800
 acagccacct caaatgtccc cagatagtcc acatcccagc aacagccgac ttcgccaat 10860

tggggcagcg atttcacctt catctcacag agttcaatga gtatgttgcc aaggacatt 10920
 ttgagtgcc attcactaat ttacagaaa ctctgtaatt gggtggaatt gctaaggta 10980
 gggattgtac atttctgtc accttcttc agagggttaa tttctgtttt ctctctcgga 11040
 tgcattctat agctcaaaaca gcagatgcat tctcttgagc tgggtaataa aggccattct 11100
 tggacaggcc caattgctct actaagttag aaggaacctc ctttttagct gacatataat 11160
 caatcagcat gcattcgggt tagagcaatg aatcttctgt aagtgacaag agactggatt 11220

tgttaatfff gctttcagca aatgtacctt aatatggata tttctaagat tcttggcagc 11280
 aatataatff aaaacatggg ttagtgtgac aatacaagag catgatgttc tgattctgat 11340
 aaaattttgt cacatatgag agaaggaaga aaaaaagggt tagtagttca gataagagaa 11400
 aataattggc tgaaaagctt ttatatttga gaatgatata aaagtggaaa gtgaaatcat 11460
 tgacatgaac tgagaacttt gacggacctt tactctggaa ccgcaattgc ccagctgtgc 11520
 ctgacatgat cccatttgaa gtcaggggtc atgatataaa cctctcatct ctgattttcc 11580
 cctaaccagg gctccaatgg acatctcaga attcctcaga acccccacac tctccaacag 11640
 ctgactttga tagtttgctt gttacgaatc agggcagcaa ttgatcact tctcatatgg 11700
 tccaatacat atgttgtcaa gtaaagtaaa aagatagcac aagaaatfff tactagatat 11760
 aattgcattt gaatcacatc caactatgca tgaaaacagc atagatatca cctaagactc 11820
 ttactaacga aagttcccca caaaatatct tagtgcagtg attctcaaag ttgtggtata 11880
 tateggaatc accaggggga acttggttaa atgcagaagc ccaggtttt gtctacttga 11940
 tgaatctgag cccctattct ttattaactc cccaggttaa ttctaaaaca cttctgagtt 12000
 tgagaaccac tgatgtagtg ttatagaaag taagtagaga aaaggatgag ctatagataa 12060
 gagggcaaca ctttctgccc cttttccac tgcatgtagg acatgttgag gagtggttta 12120

gctggatggg aaagcaagtg tcttttttca tcacttttca ctgagcagge agtttctcaa 12180
 ttgcagcgcc ttctccctct gactccatgc ccatacacac attatgaatc cgagggccgg 12240
 tgcccatgca gccatacaat agagacaagg accaattttac ttgccaacta aacatgtagg 12300
 gacatgctgt ctatcctcaa cacagataaa acctgcaggt gctcttctt ttgtgagccc 12360
 agtgcttctc aaccttggtt gcacattaca attgaagaat gtttcaaact cccattgcc 12420
 caagctgtaa cacagtctag ttacagctaa attgggagga gagcacaggt tttggtggtt 12480
 tataaggctt cccaggtgat tcaacatcta accaaaattg aaacaactg tctctaattc 12540
 agattctcac gaatgaggca gattcatcct gcatttaaga gagcaacctg taactctaag 12600
 gttacttctt ctattgtata gtctcatgat ttggtatcag attaatgagt ttaaaatatg 12660
 agaaaatgtg cacgaagaaa agtcccagag atctgattgc ccattcctt tcttttcta 12720
 cagtcttcag tctaggtgac aatgcaaata taaacctgct cttttcagga agaaaatacc 12780
 caccacacca acatatggaa atagaaagac tgtgtaaacc tgattctttt ataaggcgtg 12840
 taaagagaga aatgagaaca gcacatttga aattcagatt taatcaagaa gtcttaaaact 12900
 caataaaaag acaactcaat ttttaaatgg acagaagatt ttagtagata ttttatcaa 12960

agaagatata caaataacta ataagcacct gaaaaaaagc tcaacattat tggetattag 13020
 gaaatgcaaa tcaaaaccac atgaataaac acttactcat cactgaaatg gctataatca 13080
 aaaaaacaga caataaaagt gatgtcaatg atgtggaaaa actaaaacgc tcattaatac 13140
 attgtggtg ggaatgtaaa atggtgtggc cactttggaa agcagtatgc caatttctta 13200
 aaaattaaac acaaagttac catgcaaatc agcaattcta ctctagtag tctctccaag 13260
 agagatgaaa atgaaagatg gccacacaaa gacttgtatg tgaatgttta ttatggataa 13320
 tacccecaaa gtggaacaaa cgcaaatgtc tttcaactgg taaatggata acaaaaatgt 13380
 gatatagcca caaaatggaa taatttcaa caataaaaag taatacagta ctgatatagg 13440
 ccacactatg catgaacttc agaaaattat gctgcacaaa agaaatccaa cacaaagtcc 13500
 acatatttta tgatttaatt tctacaaaat gtctagaaaa gataaatctg cagagacaaa 13560
 aagctgatta gtggttgccg gggactggag tggatataaa gaatgactac aaatgggcct 13620
 gagagatact atttgctga gagaatgtt ctaaaattgg attgtggcga tggttgcaca 13680

actctgtaaa ttactagaa gttaattaag ttgtgtactt aaaatgggtg aattttatga 13740
 tataatatatt ataataaagc tatttagaaa aacatgtaga attgacttta caattctgca 13800
 aaaataatgt aaaaatttaa gtagatataa catgcaaaaa taaagcttat tacttttgaa 13860

aaaattactt caaaaatatg aaaatagttt aagctgcagg aattttttta aaaaaacaaa 13920
 ctctaaaaatg ataatttga gcattgacta tattccaggc attattctaa gtgctttata 13980
 tcattttgtc ctataaatga gcctctaagt ttgatgttat gttccattgt actagtattg 14040
 aaactgaggt ctaactagag ataaaagact gatgctagaa taagaagaca gattaaaagg 14100
 aagatggtag tactaaagaa ataatttgag taattttatag tgcgtttgca taattgtaac 14160
 tggattataa aagaatgaaa aagagaatag agacccaaat ctagtgttga tcagatgaag 14220
 attaaagaca tcacagacaa tgcagagaaa aaggagaaag agattaaggt gatcagagaa 14280
 tagatgatag atagatacag atgacataaa atgaggaaca gagtagggat aattagtgtt 14340
 cttgggggtgc agaggagaat caacataaaa atattaaaga tattatttaa aatgtctttt 14400
 tagctgaaga gaattctaaa cataaataat actatcatta gcaagaataa atatcaggca 14460
 ataattgtacc acaactgcac tgagcacaca tcagctcctt gaaccatcac aacaacccta 14520
 ggaagcatga actataattt ccattttaca aaggatccct agagctaaga tgactagata 14580
 tcttgtttgc ttaggacaat tctggtttac tgcattgtaa ctacctaaaa taccattttt 14640
 attctcaaat ttatgagtct ggacaataaa ttacatgatc accctatttt gagtctaaga 14700

actacaggtg gtaaactgca gaacccaaaac ttattggaga agtctccaaa gcctttgttc 14760
 ttaaccattt tgttatacta aatctgcaga gctaaagtgt tcatcacaaa gcgacacaac 14820
 ttgtaaaaaa taagtgatta taccaagaaa ttctgcattt caaagataaa taaacaactc 14880
 tatatgcatt cagtagaagt aagtcattta aaaaggaaaa agatattaat taatttcata 14940
 agtaaatgaa aaatagtacc ctggatttct tctttacaac attaaatgcc agaaaacaat 15000
 gtctacaaag tcaagttaga attaatggaa gctctcaaat atacaagtag ctaagaatca 15060
 agaagtcaag caactactta aagacattgt ccagctaatt taggtagaaa tcaaaattta 15120
 gacttcacaa acacataagt aagatacaga agtacttata gtgggcaatg aatccacttt 15180
 aatatcaaat tatgtaacag ttgatctggt aaatatcatg tctagacaaa gtatacatgt 15240
 gatatttctt ggaagacaat atgcaccata tctaacttcg atcctgcac aaaaattcca 15300
 ctggttttag aagaggccga gggagcagtg tgggaagaaa tgcataatgag ctgcttttcc 15360
 cattttcaca aggggaatcc aataaataat gtcttattec tgttgttgat aaactagcag 15420
 tctgaaattt agtcaaaatt ttaagtgtgt aaaaatatac atcagttagag caaaaaaat 15480
 tgtattatct ttcattgtgc agaagaaaat agaattaaag aaaaccttag aaagataaca 15540
 taaagaaaaa atgcaaaggt aatactaaaa cttaaagaaaa tattttaaat agcagtaaaa 15600

gacagaaaaac aaaggtaaaa atcaggaagt atatagagag accaaacaca ggatgtttta 15660
 tactaaatac aaatggttta atcactctct tattaagaaga aagatagcct catattaac 15720
 aaaacaataa gtaaaatata ttacaagag acaccaaag ccaatgatta cagaatgtag 15780
 agaataaaaag aatcagtaaa gatatgcaa agaaactaaa atataataca aatttaaaaa 15840
 tacagtataa cagctattta cctagcattt acattgtatt taattaatct agagatgatt 15900
 ttaagtatat gtaaggatat gcataaggta tatgcaaata ctacaccgtt ttatataagc 15960
 gacttgagca tcttggattt ggcaccacg ggagtcttac acaaaatcct ccattgcatac 16020
 caagggattt gtctgcttat ctgacttact taaagaatcc tgattttata gagcgtgacc 16080
 atattctcag cctcccttgc aaataggaga agctatgtga ctaagtcttg accagtgaag 16140
 tataagtgga agttactggg agggcttcca ggaaaatcc tttaaaaaga gctgagctcc 16200
 cttttgtctt tcccctttcc ttcttcatt ggctggaatg caaacacgat gaagctgaag 16260
 tgtatatctt acaaccatat ggtgacctta aagatggaag cacttcatca aggaaaacag 16320
 agcaagaaga tacgatgagc ctgggtcact aatgatatcc tggaaccact tcaccacccc 16380
 ttgattcatg ttaccactaa ttccccattg ctttcttaca ttaattcaaa cttgactttg 16440

taaaaattat tttctggcat ataatgttgt aaagaaaaaa ttcaagatac tgttttttta 16500
 tttacttact aaattaatat agtatttctt tattagtgc tcaactttac tgaatgcatg 16560
 taaaacttgt ttatccttga aatacaggat tccttggtag aaccactttt ttttcaaaa 16620
 ctagtgtgt tctttatgat gaacactata atagctctgc agatttagtg taataaaaagg 16680
 gttaagaaca atagcttttg agacttccat gactgaaagt tttggttctg caacttacca 16740
 actctagttc ttaggccccaa agtaaggtag tcatgttatt taccttgtgt cttcaccaca 16800
 ataccttgac tctatcttct ttgagggaaa gacaaacaag cattctgttt tgttcaaatt 16860
 gctctttttt taagatctct gtacttggac taaaaagcaa ttattaactg atatcagcac 16920
 ataaaattag tttataacaa atcaaaatcc aagggtaaaa aattatatga gagtcttttt 16980
 acttgatggt tgacaaatc aacataatca cgtgtgcat gaatcttttt atgacaacaa 17040
 tacagcatca aaatgtacag tgtagacctg gaggaataac aaagagaaac acagggcccc 17100
 aataataatg gaaaacataa acaaaccttt ctgtgccttt gacaaattag gtagacaaaa 17160
 gctaaaagggt aaagaaatga gattctagag acttcagtag aactaagagt acctaataaa 17220
 atgcttctaa aaatatgtgt gtgtgcgtgc gcacatgtgc acacacacag gcatttgtga 17280
 aattatctta taaatagaat tccagggtatt ttttcaaaaa ctgaacatat atatataatg 17340

ttttaaaata tttcaaaaga tagaacttgc cttcaaaata taattcaaga aataaacaaa 17400
 acttgaaatt aaactgaaca aaaatataaa catttagaag tcaactccaa gtaattcttt 17460
 ggtctaagaa gaaatcagac acacattgta tttattgtag aaaataatga aatgaaaaat 17520
 accacatata agactctcca ggtcacagct aaaagcagat tcagaggaaa attcgttgcc 17580
 ttaaatgctt caattataaa tatgaatgaa tgaaaataaa cgtaaagtat ttaatccaag 17640
 cattcagatt ttttaagac agcaaaatta agaaagaaaa agaaggaatt gatgaagatg 17700
 tagtaatagc aattgtactt caataaaata ttttgaggaa ataatcagac aagagctcaa 17760
 gaatgtttgt tgggtgctgt tcttggaaac tcagaaaaaa ctttaattctt tattataggg 17820
 atgattgaat aaatcataac acatttcatg ttagcagaac aaagagacac taaaatatat 17880
 accttaatac aaaaatctac aacaagtgga attaaaaagc agaatgcaga gctgaatata 17940
 agaatcacia ttgggcactg aggaatacat tagcagttaa tataagttgt gtctttacat 18000
 cttcaggtat ttatttaaag gaactacagt ttggtgttat aattagaaaa atacaacct 18060
 aaaagtatgg actgtgaaat catatttatt ctagtgtcct ctttaagta gaacattgca 18120
 ttccatttct ttagggactg tatttcttaa tcattgtaac aggtataacc tctgtaccc 18180

attacagcaa gcaattacta aatataatat accacatttg tcttttctgc aggatcccaa 18240
 gaatttctct gccctcaaag caattttctg ttaaatgcta tgctgaggat actcttattt 18300
 catactaag atttagaacc ctcaccacca tatcagaatt ccaagccaaa actaaggtag 18360
 tatgaaaagt taactgggtg ggaaagtcaa tggtcatttc ttatcttatt tctctacttg 18420
 aagagttatt ccttaccag agctctccgc accttacta tggggaaata tgcacctact 18480
 ttaaggaaat attatgggaa ttaaatgttg tgacatctt caggcacca gcacagtgtg 18540
 gagatggagt tccccctta ccttctccca tattctttcc tgatcctatc tgagtaatta 18600
 caactcttcc aaccaatcca cttttacaca gtttttttta tagaataaac atccaaatgc 18660
 agcatctgtg atatatctga attaaatagt ggggtcaaca acatggctat ttcaagctta 18720
 aatgtcagct aatttttttg aaagcaaagt catgggagtg agtgtctgtt tacacctaat 18780
 gctgagaaat ttaatctctg caggtgtgta cacattctga tatcagagga tcaaaatccc 18840
 actggtggaa gttaatttcc tttgctctac aatccacact taccattctg cactcagggt 18900
 ggaaaataaa acttggttcc ttcattccaa gttactaaaa acaccaagc ccaaaattta 18960
 acctcaaac tatgagctct gcttcttgg aactcaaaag aataattctc tttgctactc 19020
 agagattaat cacactgcct ttatcaccta ctatgcttgt gttattttac tcttcttttg 19080

ttatttaact gagagcattt gtgtctatct taccacaaca aacctgaat ttgcatgtgt 19140
 cagggaagct ctggcaaaat ctgatacaac ttattcctca tatattaatt gcttaataca 19200
 gtttttgtga ttgaattttg agctaataac atattttaat tcaatacagc atgcattttt 19260

101

102

aaacactctg agaatgtcca aaaacaattt ggcaacttagg taagaagaga ctttattcag 19320
 gctgggtgcg gtgggtggct cagcctgta atcccagccc ttcgggagge cgaggcgggc 19380
 ggatcacaaag gtcaagaaat cgagaccatc ctggacaaaa tgggtgaaacc cagtctctac 19440
 taaaaataca aaaattagct gggcgtgggt ccatgggcct gtagtcccag ctactgggga 19500
 ggctgagaca ggagaattcc ttgaaccggg gaggcggaga ttgcaataag ctgagatcac 19560
 gccagtgcac tccagcctgg caacagagca agactccatc ttaaaataga ataaataaa 19620
 ataaagagac tttattcgaa aggattagtg caagaggag actggaccat tacagtaagg 19680
 agaaaggggc tgtttagtgg ttgagaacat tcttatcatg agatctggaa gtatctcaag 19740
 ggttaggaaa aaagagattc tctttcatag gaaagaatag acaaggctag aaagaaccag 19800
 gtgtggagaa gtacatgac aggagtgcac cgatctgcca gtagatgagg gaatatttta 19860
 ccttgaactc tgcagcgtac tccagggaga ggctgtggag gaggagctgt gtgtggctg 19920

aggcctgagg cgaggacaaag ttcagcctag gagaagcaaa gaatcttaac caaagttggt 19980
 ttagcctgca ttttttctg attgatcagt ggggacaaaa cagcttagct aatatcattt 20040
 atgagacaaa caaaaggaat ttagagggtc tgcgtctggc cttgttataa gtgttgatgg 20100
 ctatttactc tgtgttgcta caaaaatata tgtgaaattg ggtaatttaa aaagaacaga 20160
 ggttcatttg gtacacagtt ctgcaggctg tacaagaagc atagtgtcag catttgcttc 20220
 tggtaggggc cttgggaagc ttacaatcat ggcagaaggc aaagtaggaa caggcacgcc 20280
 acatggcaag agaggagca agagagaaag gaggaggtgc caggctcttt gaacaaccag 20340
 atctcatgag aactaaaac aagaactcac tcattactgc aagaacagca ccaagccctt 20400
 catgagggat ccaccccat gatcgaaaca cctccacca ggccccacct ccaacattag 20460
 aggtcacatt tcaacatgag atttgaagg gacaaaacat ttgaaccata tcaatgccc 20520
 caaggcagca ttggtgaac tgatttaagt cacatgggga ataattggtta gctgcacaaa 20580
 gccctttctg gaacacaaag cagtgggggc atttattaac cttttctgtt ttccaggatc 20640
 acagggttct ggtaaagtgc aaactgtc gaggatacaa ggagaaaagg tgcagtgtct 20700
 ccattcagga atttgagac taaagaaaga gtcaaggaaa aattgttcac atttttaaaa 20760
 atagtaacga ttaagcagaa gacaagaagg aagacaatta gatctcattt gatttccaat 20820

accttcatga tgcaggcacc acagtctctc agttaacaga tgagaagaaa gaggcttaga 20880
 actgttaagt aaataatcca gggactcaca gacaggacat agcagagcca agtttgaac 20940
 cagatcattt tgacagccca gggcacagtt catatatgaa aaggccaact aacaaaatgt 21000
 tagctaaca atgcatcact gtggacagtc aggaataacc tgcaagctcc agaactttct 21060
 catttacata gactaacag aaacttttgg actttccctg caatgaggca gagtgtcaat 21120
 cctactgag atggacccca ataaccatta aaaatacata tataaaaaac aagtttaaat 21180
 attttgccta taacttttat tccaaagctt atgaactctt ctcttttagc attacaggaa 21240
 aatgatgtat ttgttcaagg atataaaaat tgtggccagg gctcccatag tgaatgtatg 21300
 aagcaggaag ctggggggat ccatggaacc ttgagcattc tcttcagaa ctctccatcc 21360
 ctgctaaagc taaaatgcct gtatcatggg caaagcttgc cactacagaa aggtcaaac 21420
 ttaaaaatgt tcttaccag tatctccag tagtatgtgg ctgatatgag actgaggcaa 21480
 agcttctctc agcagaaaag aagggactca gtaacctggg aaagggtgacc ttcattctaga 21540
 aaaggagag acagaatttc tacaatgag ttcaggtaag aatgtgtatt agatttctcc 21600
 agagaaacag aaatagaact aataggagg gtgtgtgtgt gtgtgtgtgt gtgtgtgtgt 21660

gtgtgtgtgt gtagggagg gggagagaga gaaacagaga gagaaattta ttataggga 21720
 tacaatatga aataatcatt cacacaatta atagagacta agaagtcacca agatctgcaa 21780
 gcagcaagt tcaggcctct gagcccaagc caagccatgc catccctgt gacttgacg 21840
 tatacgcaca gatggcctga agtaactgaa gaatcacaa agaaagtgaag aggcctgcc 21900
 ccgccttaac tgatgacatt ccaccattgt gatttgttcc tgccccacc taactgatca 21960
 aggtactttg taatctcccc cacccttaag aaggttcttt gtaattctcc ccaccctga 22020
 gaatgtactt tgtgagatcc acccctgccc gcaaacatt gctcttaact tcaccgccta 22080

103

104

tcccaaaacg tataagaact aatgataatc caccaccctt tgctgactct cttttcagac 22140
 tcagcccacc tgcaccagg tgaaataaac agccatgttg ctcacacaaa gcctgtttgg 22200
 tgctctcttc acacggacgc gcatgaaagc aagctggaga cccaggagag ctgatgtgta 22260
 gttccagtct gagtatgaag gcctgagaac caggagagcc aatgggtgtag ttccagctcg 22320
 aaagctggca ggcttgagac ccaggaagaa ctgatgttcc agttcaagcc caaaagccag 22380
 aaaaaaaca atgtcccagc tcaaagaagt caggcaagag gagttccccg cttttcacag 22440
 aagaattagc ctattttatc tattcaggcc ttttaattgaa tggatgagag ccattcacat 22500
 tagggagggc aatctgcttt actcagctcg ccaattcaaa tgctaattctc atccagagcc 22560

acctcacaga cacaccaga ataatgttta actatttggg cactccatgg cccagtcaaa 22620
 ctgacacata cagttaatca ttataccatg ttagtttgc tcttggtcca ctcaacttcc 22680
 ttctaactac tgtatagtat tccatttgtt tatatacatg cacagttata ctttataaag 22740
 atgaaagggc tgggcacagt ggctcacacc tgtaatccca gcactttggg aggccgaggc 22800
 aggtggatca cgaggtcagg agatcaagac catcctggct aacatgggtga aacctgtct 22860
 ctactaaaaa taaaaaaat tagccaggcg tgggtggcagg cgctgtagt cccagctact 22920
 tgggagggtg aggcaggaga atggcgtgaa cccaggagcc agaacttgca gtaagccgag 22980
 atcgtgcatg tgcactccag cctgggcaac agaaaaagac tccatctcaa aaaaaaaaaa 23040
 aaaaaaaaaa gaaacaacca tatttattat ttgtctaat attatgtttg taagttccat 23100
 ttatgttatt ttgtgtaca gatcatttcc ttattgttat atagtatttc attgtgtgac 23160
 tacatgaaaa ttatttcac cagttgatgg acatttgggt ggtttccagt ttgggatgat 23220
 tcattgattt tgacatcatg aatatttagg ttgcttctga tacgtttctt taatactttg 23280
 cgaaggcatc attttgcag actgcttgta tagatacata aatgtttctc ttgggtggcc 23340
 acagggtaaa caatggctta tctggatcat gaatggagag aaaaggaaac aaccagaaag 23400

ctctctctcc ccacctatc tctgtccatg gcatctgcca ctttctctca ctctgccct 23460
 accacactgt gacctaacca gcttctacct tctcccagga gtctctcaca gattttgtct 23520
 tataaacatt ttctgaagt aaacataacc tacagaaaag tgcataatgt ttaagtatgt 23580
 agtgcaaaga atttatgtga attgagcata tgtaagtaac ccagatagag atgaaaaatt 23640
 attagcatct agaaatggaa caatgcatta gaggatatgt aattccagct ttactaaata 23700
 ctgctgaatt gcttttcaaa aattaccaca tcaactaact ctcaccagaa gtaaatatgt 23760
 acaccggttt cccttcaatc ttgtcagcac ttggggatag ccacacgcta gctttcacta 23820
 taataatagg taaacattct tactggtttt agttatttcc cttaattttt aatatggttg 23880
 agcctatctt catactcatt tgttagttgg aatatgtgc acttggtttg ctattgagtt 23940
 gttgtcctgt ttggaacct tcttaagag tccacagctt atccagtttt ctacacaact 24000
 cacttctggt tgctgccctt cattatagac tcaatgcctt ctcatgtcta gagcactgtg 24060
 ccctccttgg ggctcgatgg ttataataa agcttcccca ggagatctca tgggggccag 24120
 gttctttagt ggtggccact aaagctacta cctcttattc caggtgcat aaaccagtgg 24180
 ctggacctgg ttggttcaca gagtgttctc aatgtgagga atcaggtatt gtgcttggtt 24240
 gtcataaag cagcttagtt cccattgttt tatacctggc ctgctaccct cattcatggt 24300

accttcatgc cccatagaca tttagattt gatgcaaacc agtctgttac agtaaaagca 24360
 ccactgtcta ggaagttctg gagatgggtt atcagctcat ttacatcagc agctgcggga 24420
 tcttgggcaa gtcatttcac ctattggagc cactctctgc tagcataaag gagaacataa 24480
 agataccttc cctgcctatc tcacaaggtt gtttgggaaa ctgaatgaaa gaacgtgtaa 24540
 atgtgctttg caggtttttt gtgaacagg aatagctgtt agtattctcg cctagccctg 24600
 tctgtgtgac ccaggatgct gcattacctt cttctacctc tcgccctgag tattgttctt 24660
 aggtagaagc tgaggtgaat atactgaaag cagtaagaat cttcaccagg cccctcccag 24720
 tcatatcaca aggtgttgta gcttattgac aaacacagac ctcatgttcc tctgagaacc 24780
 gccctgtgaa cacctagata gaactaaggg tgtgaaatac aaacgtacta ttgctctaca 24840
 cttacggaaa taagagcaca tgacacagta gatggcaagg tgaggcttta agtcagaaag 24900

105

caacctcagc tgaacaaaat gcataattat aatttgattt cagaagtgga aacatgaccc 24960
 gaattcatgc acctactgat tagtccaaat tcctttattg ttgaagctgg agcagaagtg 25020
 ggggtccacc gtggaagtaa ggaaaagcaa aacagaacag ggggtctcatc cagggagcca 25080
 tgtc gatggc tatggggagc tccaccttgc tcttggggtg gggccctggc cctgggtggg 25140

106

actgtggggg gatgaggggt gtgctatgct ggctacctgg tggtaatgca caaggagaga 25200
 gcagcacgta gatcctccct gtcacaggc agagctcttc agtgaggagg gctcagggag 25260
 ggctctgtgc ctccgttcag cagagctgca gctgctgccc agctctcagg aggcaagctg 25320
 gactccctca ctgagctgca ggagcaagga cagtggaggct caaccccgcc tgagccatgc 25380
 cagecaactt cacagagggc agcttcgatt ccagtgggac cgggcagacg ctggattctt 25440
 cccagtggc ttgcaactgaa acagtgaact ttactgaagt ggtggaagga aaggaatggg 25500
 gtctcttcta ctactccttt aaggtaagtt tcttgccctg gactctgaac actgacttat 25560
 aacaatgaga ctgctggaac ttaagagtgt caattgaagt atcatagcca gtattgtgaa 25620
 tgagtgttat tttctttact aaaaaggatt tttaaaagtc tgaagtgcta aaacaacaag 25680
 ctgtagtggt cagagaccta gattgtagtt tcttaggaat acagggtgacg tttttcttct 25740
 tgatgctgct ggaatgtgt gaatcgtgag taacatttat gagtggatga tttttacttt 25800
 ccccttttcc ttaggtgaaa gcacttttaa ttaactctat agcagtactt gaaatgtctg 25860
 tttctagtag gggtttagagc tatgagtttt ttgctaggaa caccagagat gcggaaagct 25920
 cacaatcccc aggacagtga ctgatatgat gagaacaac attgaataag gcaggaagga 25980
 cgacactttc tttgatgac cttttcatta aacatcagtg aggaatatat ttttttgagg 26040

gtagttgatg atgccaccat ttgcaacaaa ttacctccta gaacaaatga aggacagaga 26100
 gtttggtgag tttcaccttc aaagtatcca agggccacac tgaggaagga tcttcataa 26160
 gctaatactg tattgtttct tattccgcaa caagatcttg tgacagaaa tgaaccgcac 26220
 atttgggaaa agaacagttt cctgcttctt gcctcagaat gctgggttgt caggttattt 26280
 cacacctgct taacgatatg ttagtgcatt gcaataatc acagggtctca aactggctct 26340
 ttccactgaa gaaaaaatac ttcaaaaaga ttctagtgtg tgctttgttg ggtttgttg 26400
 ttgtttgttg tgtaaatcct ctgtatgttc ttgaaatgat ttggttttta cacaatgaga 26460
 tagcattact gtaacatcca cctccctact ggaagttcac ttcttttgca aatattcaga 26520
 ataaaacttt cagcaggggtg ctgtcccagg agtcagactt aaacttcag ggcctaatg 26580
 atcctgcagc aaagcagaac ctgagcaaac tactctccta ctggcttcag tgaaccctg 26640
 tcccttggaa tcacctccta atgcataatgc acatagcag cccagctgca cagctccagc 26700
 atgtagctta gaaagtaaaa ttagagtttg ttgccactta atgtcgactg aataatcccc 26760
 tttatgaaat cagcctgcag acccagagag tctgtcttgg caggtctgtg gcaccagga 26820
 agcacaggac tccactcagt attgtgcct gtgtagcctc tttgatattc ttgaacatg 26880

atagcaagca gaatgaagag aggcctccca ttgcaaaggg aataaaatca gcaataaggt 26940
 ggttattctg agactctggc aagaatcaat ctgagctgaa atctcatttg ccattttttg 27000
 aatatagcac ctacaggat atttgaata tgtgaagaaa caaatccac ctgctctct 27060
 atgagtgttt gtctctcta tctagcaac atcatcgcca gacactaaag agaatacag 27120
 catctctagc tgattcctat tgatatgttt gcagcaaac ggctggacca ctggacaagg 27180
 agaaaagcag aaagacagga attgtgttg gccaggagct tagaatgctc agattcatta 27240
 tttgagagat acgtgtattg actaaaaccc tgtgattttt agttacacag tgattactgg 27300
 tggatattgt gagaacttag cttatatctt ttagtgtaac ttttttcta tgatccctt 27360
 tgggcacaag caattctaag gcattgttga tacagaaata gttccaatgc aagcccttgt 27420
 tcaactgcaat tcattttatc tgacatactt ctagagaaga aattcgaaac catgctcct 27480
 ttactgtctc ccagatgtat cccctttaat cccattgcc ttcataaaa gcagtaaaaa 27540
 aaatagcatg aaaataaaaa tagcagcagc agtaaaagtc acagaaataa cagcaacaac 27600
 catacgtctc atttactttg ggcattcttg gtgccaagag tcatagcaag actcacttag 27660
 caagtgaact ctgtgaagta tctcatttaa ttctcacaat ccatggtgta tctttcctc 27720

107

108

cggtcctgcc ttccatcttc atctgtttat ctcaatttta cccagtctat aaagctcage 27780

ttgggttgc tctccatga agccctcctt gactcatccc tccctgactc atccctccct 27840
 gagcttcatt agtgtcacgg actgtacctc tcttcttgcc acttaatgca gttctgtctt 27900
 aaactgctat ttccatatgt gttggctgaa tgtgttacag tcccaagct ccttgagtaa 27960
 aatgaatgcc ttatatgtgt ttcataattt cccccaggac ctaccactat gttagtata 28020
 ctcaataaac attgactgca taaacaaatt gtgatgtgtt ttttcttcca attaccaaca 28080
 ttttgtaaaa taagcaacag aaagcatgta ttccctgtga cagagggtggg tgggggctct 28140
 cattaaccaa gtttccaccc atcagccctt accctgcctg gtctctatac tcaccagggt 28200
 cctttctgc aagcatgttc agcttgctcc tattccattt ctaagccaat gagaccaaa 28260
 tcggttctag attccagtgg gtggggtatg gaattagctg aggcaccatg agctgggtacc 28320
 aagtacctgg tccagccctg gggaatccat ctctattgca tggcagcctt acctagtctc 28380
 agctgtcttg ctccgtccac ttacctaggc tctgacttc gtttccatc tcacattcta 28440
 gttcttacc tctgaactcc aaagctctt caggaggaga caaagcacc cgtctagatc 28500
 ttactggcac ttcttcaca ggcttagagt ctgttcttc ctcccacct cacccttgaa 28560
 ttctgcttc tgcttccacc cctetaacct actctacct cctaagcatg tgaggctctt 28620

ggaaatgagc agggaggtct aggggtgggt caccatccc atcttccacc atgggccttg 28680
 tgtaactaac cctacgtggt cttgggttca agattctcag ctccagacct ggctcccttc 28740
 acagtttcca gttttgtgtg cttttaagat cacatccagc tcacctcttc aagacctagg 28800
 tcttgccact aaggaattat atgcgtttca agaacttacc agaagtttcc aaggggaaat 28860
 gggaaccagc tcatcagaaa ataatgagg tatctgaata taaggctgtc caaatgcaaa 28920
 acaaatacaa aactcttcac acagaaagcc ctttaatttg ctggtgaatt caccagcaat 28980
 gtttctgaa tctctgatac ttaatgagaa acctaatag aagtaactgg gagggagacc 29040
 tgtcttgatt agtgaattat ctaaattata aaataatgta aatgaaactt agttttatta 29100
 ctcatagggt agcacagaaa catgaactaa gactgctaaa tatcacctaa taacaatctt 29160
 ttattgcgcc tcttcgggtg gatagttaca agtgatacac aattagtcta ttgtttatat 29220
 gtaaattggt gcttctaagt gcttgagggt gatttgacac agtttgttcc cttgtttgt 29280
 acacctccc tgccacgtg ccttactgtt aattttctta acacactctt cctccattaa 29340
 tataacaaaa gcaaatctca actcaacgca tgcaccaatt atctcacgct atgcttttgc 29400
 aaggagctc ctctctgcc tggccccagg acagtgtcag ggatgtcctt cctggaatcc 29460
 agaatccctc atgtcccaac ccccaaatgt atctctgca atttgtaacg agaggtcttg 29520

catttacatc atgcattttt tattcttttc taattagtct cgtcagtat gttcaatttg 29580
 agtttctaca gttgaatact gtggtgtgct ctaaggaaat tactaccagt ttgtctcgtt 29640
 taaatcatta ttaacatat tattccttcc tgccagtctt gctaccaga cctagtgtc 29700
 tgctttccaa tccctgacc tgggtaaact ctaccgtgca gtgtgtccaa ttctacttca 29760
 cacaaatgag aaaggctgag gatggcacac aatttccaaa ctatagacgc tagtatttga 29820
 aaaggaaatc ttctcagct aaatttctct ttgcattact aatacatttg atggcaggaa 29880
 gcataatctt agctaattca gaataaacct agtcattgca gagcttttca gccagggaag 29940
 agttttcaca ttttctggct tcgggaaggc atctaactcc aggggcagtg cttctgtagt 30000
 gcatttctct ctctctctct ctctctctct ctgtgtgtgt gtgtgtatgt gtgtgtggcg 30060
 ggggggagtg ggggtagagg atggatgggt aagagagtct gatctactga gggatctgag 30120
 caagtggca tcagctgaaa caagacctgt ctgtccctca gatgtgggtca tctctgttct 30180
 ggactttcat ctgggttccc atccgacctg tgtcaggccc acattgcttt ctgggtaat 30240
 gtcccttggc cacattctct cctggtacag ggtgcttgaa tccctgtctc tcaatccag 30300
 cgataatttc tgctctcttc ctaagaatag aaagtttgac tgctaccaac tttgggctgc 30360

agaaaacaaa atggagcatc tctggccctc tctcatccca catagccacc tacgtctatac 30420
 aacttccacc tcatgataga tgggaaaatc tgggagactg tacttccctg gtcctacac 30480

109

agtaagtggg cctcagcgcc cttccaatcc tgtgctcccc aaatgtagca aatgttctct 30540
 cttctccgc ttttctctgc taacccttgg agggggggcaa tccaataccc tcttgctcatt 30600
 gtctcagttg cctcgcatct ccccagcatc tgacaccact gctgcgccat caaactcttc 30660
 catcgccctc agcgaccccc ctgtcatggg gaaattgatg acacagtgtt cttccgaatt 30720
 tattattcca ggctctctgt tctgaatgct caaaagtcac accctcttgc aacagaaaaa 30780
 acccatttct cttccagctg ttttaagatat cctcactgag gtattttgaa agcccagtgc 30840
 tgacttgttt ctgtccatct gcattgataa agagtgcagt ctgaggacag tggggctgcc 30900
 tgggctgggt gacagtgtat caaagaagtg gaaagaagca catccattca tgcttgacaa 30960
 tgtcattctg ccaccttca aataatttcc tgttgatgaa gtaagaatgt ttcaagccat 31020
 gcactcaggt agataagaaa tctaacta tttttcttaa ataaactgag cttctctctg 31080
 gacctctcag tcccccaagt aaactcaggc ttttgagctt tctccatcat ttcaatgagg 31140
 cagtgtggct cagagagcag gcttttagagc cagacttctg gggtcaaatc ccagtgccac 31200
 accatctagc agagtgactt tgggcacttt acttccaccg gtgtctcagt ttcctcatcc 31260

110

aacaaacaaa gctaataatt gcatgtcctg tagagagttg ttgtgaatag ttaagtgaga 31320
 gaatgcttgt atagccttaa agaacagcaa gcggcccccga ggagtgttca ttattcataa 31380
 ttagagtcce aggaattcgt cattccactc ttttctcaag acaactactg agaggtgagg 31440
 aggcagcatt agctgtaagg aagaagtttc ggaagatgct gagagagacc actgcagggtg 31500
 gaagcacttc aggacagctt cgatatgcag gtggtcctca aacaatggtc atgaattaag 31560
 ctgtttcttt tttttttttt aaaaaaaaaa aatgagacca tgaaaatgta gaataagata 31620
 tagatataga gggaaaattt ccatttctta ctttctcctc ctgatattat gtctagctat 31680
 tatctaagca aacttaatgg cccactacat gaaaggctat ttgcagaaag agcaaaattat 31740
 gccctatctg gagaaagaaa gaaatggctt cttctctgct gtgaagattt tccaggccac 31800
 agatggcaaa atcacccaag gtcatgagga agttgtaagg aataatcaag tttcttggtt 31860
 tcccacttag gcaatattga tggtgccta aaaatgatag atctattact cttgtcagca 31920
 ctttacagtt tgcaatatga tttcacaata tcacctttga acctcccatc agctctaggg 31980
 ggatttaaaa tagcattctt tttctttgag cagatatgaa actaaagtct gaggggaagt 32040
 aaaggtgtaa acttcctaaa agttaagata aggtaaaaat aaaataagaa agaaaagaaa 32100

gagaattctg agctgatttt ggtctggata ggtaagctc tccaacagta aaaaacaaac 32160
 cctaaatctc cgtgatttaa cacaccagag gtttattggt cctcatatc acagtacaa 32220
 acaggtaac ttgtagctac accttctaga acaagtggct tccaggggtg atggtaaat 32280
 ttctcttget gtctttggcc tgaaatgaca catgactttg actgaattcc attggcaaga 32340
 attaattacc tcaataggca acagaaacgc ccccagggtc gaggtataa tgcatggctt 32400
 taaagatttg atccttacct tctggcagat aaaacccaaa tccctgggcc tggcctactg 32460
 gcctttcaca ttctgacca atcaccttct ctactcctct cttcacatcc tggaccacgt 32520
 tgtactgact gtcttaccat agtctgagga tacagggtcc tgtttacctt ttctggatat 32580
 gcctttctea cactttttc ttctgatata acgctaacct caattgcctt ctcttctagg 32640
 aaggettcag aattgttcag tagtccagca tcatcacatc actaccctc tgctcctaaa 32700
 gcaacttaga tctctgtgca atatggttc tctcttgaca tgcatgttca cctacataca 32760
 cacacacaca cgcatacaca cacacccatg agcacataca catggacaca tacaataca 32820
 cagtgcaga cacacatgcc cacacacaca cagactagat gtcagttatt tagggacacc 32880
 tttagatcct actattccta gtacagtgc tgacacacag cagataaaag gtcagtaaat 32940
 atttgttga gtgaaagagt atatcaagaa ataactctga aaacaagttt actgctaata 33000

tctcaataag ctcatgtgaa tgaatttggg tagataaagt cttaatcctt attcaccaac 33060
 catttgctt gaatttatag gtgtcataat ttgggaggga ttctgtacat cacagtaagc 33120
 catgttctat attatttagt aatgatgagg aataatgatg atgctatcgg attttgggaa 33180
 aaatccgtag gattggtag tagaggcact acacaagcct ggaaaaggga aaggaaaaga 33240
 gaacaggttt ctgtaaccca ggatgacatt tgggtgaaac aatacttagt ttcaacctcc 33300

111

tcctcacttt cccagctaag tactcactct cctagtctcc cttgcagtta aaggtagcac 33360
 agtttgggaa gcttaattgg aagtctctga gatttctaataaagattttt ccttttctga 33420
 tgaaagcgga aagatattgc tggcattctg atgtccccc gacttgaatt cagacataat 33480
 gcatggagcc gcagcagcca tttgtgacc acaggaaaaa aaagccaagg gaatcttagc 33540
 aaattgagtt cagcagcaac atatcttcag atttcttatt atatgaaaaa aaataaatct 33600
 ttgtttaagc cactgctaag ctgaatactt tcctaattga tataaatact aagtgttaata 33660
 cgacattgac agtattgaag ccaagatctt aaaacatggc cccagagag tcaagcagac 33720
 attgcattat tacacatttg gaggttacag aggtctggac tgcccattgt tttgtcttg 33780
 ttattatcta cattacaaag agattgaata gattcttata aaaactgatt cagactagat 33840

112

tgtatggttt tgagtaacca agaaagtaaa agtttctccc cctcctcaaa gaaaagggcc 33900
 ttacattttt caaatgattc tctacattcc agataataac aatgccattc acttatgtaa 33960
 ttctatgaaa aaataactaaa accattctga aaacatcagc tcaaaaaact acccaaaaca 34020
 tttgtcatt ttttcatgat ggctcaataa gaagattttt ttattctcct ccaaaaagca 34080
 taaggaatca catcctttcc tgacagetta aaacatccaa gcaaaatgtg agctggagcc 34140
 atgggctctg gacctggcag gcaggtgtgg accttcagca caccacaggg ctgctctagc 34200
 cccaggcatt tctgccctgg gtacagaaca ataaccacca tccctgcctg gatgtgaag 34260
 taggaatgga gccagttctc atgtgggagg aagagttttg agagacagga gaaagggggg 34320
 tagtcatgga ggagtctgc ttactaatct gtgacaatcc tctccaagcc cagagaaggt 34380
 gggaggtagg ggaggaccga tgccttctcc catcaaaggc cagcctccta gactctccat 34440
 tcatccagct tcttaccct cctggcctct ccactttccc cgcctttcca cttactcaga 34500
 ttctccacct ttccagacac tccatcctca aagactctcc acccaccag gctagtcag 34560
 cattgctaaa gataaataaa aaagaaactt cctgggactc ttctctcctt ctaaagacag 34620
 gagttagtgg ttggaaagga ataagatgca atcataact tgacaagact cacaagaacc 34680
 ctcatgaaga ttccctgccc tctcacaagc ctctcttttc ccagccttaa ctgcttgccc 34740

tcatccttac cagggcattc agcttggact ttgcacgctc agttttttaa aaacagttct 34800
 gtctccccc ttctaccat cctcttttta tctcatcaga acttctttct tcaataaact 34860
 gattccaagt attagcaaaa aaaaccattc taagtaaaag agttctgagt tccatccctc 34920
 aagtgtctct tcttataacc ccctaacat atgttagggg ggttaatatt aatgtaaaat 34980
 aaactcttac tctcatgcc ctctggacag agtctaaagg attcttgag ttccttaaag 35040
 aagccaaaac tcttttctg ggctacagcc acgattcacc caggcctctg aatcagacc 35100
 aagatatccc cacagcactc agaattccat tcacataaag atattgaacg aaggtgttca 35160
 cacaaggagc attattcaca agtcataatt taataaaaaa tgcagggaa tattgtgagt 35220
 gctcaaatgc aggtttctca tctttcacgt attattgtag actctaacce ttagcaacac 35280
 agagcaaccc atgcagatag aagatattct tttggctaag aatacattta ttccttttcc 35340
 aatgtattta gtcccttttc aggatttttg gtctagggtta agattaaaat gcaaagagta 35400
 ttcaagaaca cagaaactat cagcctaaaa taaaacttag aataatgtaa tgaatgcaat 35460
 tctatcagge cactcagctt tttctattga tcatttcatt catcaatcag gttaagcaag 35520
 cttatgctga ggaaacaaat aactggatat tctcagtggt ttaaaatcat aatattttta 35580

tgtttgttct ctactcatgt cccatgtcca tcacagggtta acagggtgac tccgtgtatt 35640
 gtaatctctc agggaaaccag ttgatggaag ccccatgtca acaaaggctt ccataatact 35700
 gaagtcagaa gagcaagagc tagagagata cagagtaacg aaccttgccc tggctctcat 35760
 aagcttctgc ccagaaataa cacatatgac ttccactcac tattcattgg ccaaagtaag 35820
 ttcatggta cgtctggtat cagtggagca gagaaatgta atcctcctgc tcggaaagge 35880
 agggaaatctt ggtgctcggt aatgtctaat gcaactccta aagctctgag acaggcatta 35940
 tctcttttga tttagagaga agaaaagtga ggctctgaga agataagttc acataatagt 36000
 taataatcca aaaactttta cccagatatt ggttaaaatt ataaccaga taaggcgcac 36060
 gctctttcca ccatacaga acttcccaaa agttgttcca cagaactcta attatgagag 36120

113

ttcttaagca gttgtcaggg gaatatgaaa taaagaatth ttgaagcacc acatattata 36180
 caccattata tacttagagg atgcattcac catttaactc tctgagaagt cttacagtaa 36240
 ggaaacttgt ttatggtggc tcacgcctgt aatcccagca ctttgggaga tcaaagcggg 36300
 tggatcattt gaggtcagga gtttgagacc agcctggcca acatgataaa accccatctc 36360
 tactaaaaat acaaaaatta gccaggcgtg gtggcagggt cctgcagtcc cagccactca 36420
 ggaggctgag gctgaggcag gagaattgct tgatccccgg aggcagagga tgcagtgagc 36480

114

caagatcaca ccattacact ccagcctggg cgacagagcg agactctgtt tcaaaaaaaaa 36540
 aaaaagaaag aaagaaaaga aacttgttta attctttaat atgcattttc caagtctatt 36600
 tgaccacaga gcattacaat attacctcta ataataacca ctggcacaca cttcagaaaa 36660
 cactctgtta tgtgttttcc tgaagagcc taccagacaa ccaaacagaa ctactctttt 36720
 gagcagatga ggcccagaga agtaaatga ccttccaag gttacatagc tggtagatgg 36780
 tagagtcagg acaagaactg caatctctaa ctatccaagt tggagcttct gctcagctgt 36840
 cgagaggatc gtgaaaaaac gagagtgttt tataaactgg aaagcgtat tcgaatttaa 36900
 gatagcatta attctctagg tgaagcatta ctgaaatata tagaatacat ggaaggacat 36960
 gaggtgcttc aagataggat gattaaattt ggtgaagatg tcaattctcc ccaaattagc 37020
 atataatgtt tgaataaatt ttaatcaaaa cttcaatgtg attgttttaa attgattaaa 37080
 taatttgaat tttttattta aaaaataggt gagaaaagct cagaaatttg aacacaaaca 37140
 actatgggga agaaagatgt ttccctatta gttattaata aatgtatata cacagtaagc 37200
 aaacattac agaactagca aaataattga cagatggatc aataataaga aatattttgc 37260
 actgaaaata aagtcctggt acatatatga acttaattgt acaaagaaac taccacagtt 37320

agtaaaaaag gaactagtat ttttgcaaca aaagtagtgg gtgaataatg gttcttatat 37380
 aaagttgtaa atctcagcta gattgcggaa ctaaattttt acaaaatagc tagaaaaatt 37440
 atataatgat gacactaatt tcaggactag caagcattat tcaagcctaa aaacaaaaat 37500
 ttaaaaggaa acaacaaact aagaaaatta tttgcaataa aaataaatat ataattattat 37560
 agctaattgt atatacatta attatataaa aatataacat ggttaaagtc cttaatatgt 37620
 aaagagccct tgagggaataa taaataatat ttctaattga aaagtgggca tgggaataaa 37680
 aaacaatttt agattaaata cagagttaa agaattgtgt aaaaatatt gtttattagt 37740
 ggtctgaaca atacaaactc aataattcac cataatatga gatatatcaa ataaagatca 37800
 aagcaaaata atatataaag cacagaacag ttctgtaaaa ctgtttgtgg gagagttaa 37860
 cagaacaact taacccaatt tttctggaga acaatttagt aatatacagc aaacttaaat 37920
 gatgtattca ggcactgctt agtaattcta cttgtaggat tatacataaa gtatactaaa 37980
 gaaacattca aagacagaaa caaagactgc attaatgtgt ttattataaa agtaagtctc 38040
 tagcaatgga ataataaaat tgtgatataa ccatagaatg gaattattaag gaattattatg 38100
 caactataat aaccatttct ctttgtgcaa gttaaagggt ttttaaaagc acaataaata 38160
 taatatattt caagttttat atacactcat aaaatataga agaaacaaat accaagatgg 38220

aaaagtaaga aattctctct gaaagttact ttgcagatgg tttttatttt atctttgtgt 38280
 aaaagcttac tgtattttct agagttagca catattatat ttattattct aaacgacaaa 38340
 ataaccatgt aagatacacc atgccacctc tcaaataaat tgtgtgcatt gtatttccat 38400
 gacagtaaag aggaagaatc tatttactct gcagaagccc agaatgaac ccaagcaagc 38460
 gaggttgca tgaccagag agcacattaa aggatccaga aatgcaggca aggaacaaag 38520
 acagccaatg aaaaccaagg cagatgactg gctgtatgaa ttgagtgcac accaactcat 38580
 tagcctttta cattttgcta cccaaccacc caacttagat gcacagaaaa caaagcttgc 38640
 aagagtagca attccagact ctgtagcagg aatccttctg ctgagcctct ctcagtcccc 38700
 ctccctact gttctcatct cccaggatgt tcaaatccat tccctggtcc ttacatctgc 38760
 ttctgcccac gcatgtgttc gctcctctg gtttcttttg gctacttgat tttgagtctc 38820
 ccgatggat tttaaatacc aggtccaagc caaagtgggc cctccagggg aaagtttctc 38880
 agacactttc cttttttatt agcacctcca gaacagaaaa caaattcctg aaggtttatt 38940

115

116

atattaatta cgtggatcat caggaataat acattctggg tatttttatt atatagtaat 39000
tactttgggt cctacgacat ttagagatt tggacttaat ttgctcaaat gttagtttc 39060

catatttcaa gagtctagt cttaaatagc aatttaaag ttaatctcag ttcttgttat 39120
gtagctgaca ttctattcgt ttattcagca aatattaatt actacataga cttgaagccc 39180
agtgggttc caaatgattt ctaacatctg tggtttgcta tattatggga attcagatgg 39240
aatctcagaa ttttaattgtt tcaaagctt caatacatgc tattagtggg taatttggaa 39300
gtcctcttgc gatccaagaa caaattgcaa gaagagattc acgttaaaat gattgcagaa 39360
cattggcatt tctgtttctg gtgaaattca aggattcacc agtaaccaga aaactgaatt 39420
cgaaagtaac gcaagtgcag tcccacatgc caagccctga tcgaaatgag aacgtttagg 39480
atgtgggaga ttaacattgt taataaagca tgatctacgg cccatggtag tgatgataaa 39540
aactccaaac caatgactat gtctttctgg tcagagtaga aatgactaat gcagttattc 39600
aacatgtcct ggagactaaa ctaagaaatc aatgtcaggc agtaatccag agtcactga 39660
atcactttcc tgtacagtcc cagtctgaag gtgctagtat tacattctgt cacttgtaat 39720
catggtgttg agaggtaagg caaaggcaat tcagggtgaag acaactgagg aagatgcag 39780
atggacaaga atctctctc ctgacagcag attcttctaa ctccggacaa tgacacaggc 39840
cctggacctt gtcccattat tgaataaatt ggctttcaga ccgagctcca gcttgcctat 39900
tgtaaacctt tctctgctgt tactacctca aaagtgcctg aatggccact atctgtctc 39960

actaacctgc agttctact ctctgccttc acttacgctg ttgccaggca cctactttct 40020
tagcttggct acttctactc attgtttcag actcagctca cataacagtc tctctaggct 40080
atacctgctg accaaccatg accagctcct cccaggttc tattacatgt tcttatttg 40140
ggtttctaca acatctttat catagaagtt cacattgaaa attctggttg acgtacctgc 40200
ctccaccatc agactataag ctcttctctc tgcctccct tttatccca aagtatgttg 40260
aactttgata ctagattctc agaaatgtt atggaatttg attgtacaga ttacaaacca 40320
gtataatcat gtctccagct ccatgatttt caggagagtt tcccacttcc ggcctgagtg 40380
tcattttctac accaaccatg aagccaaggc tctctctct ggataaatgc ctttccctct 40440
gccatactac atgggagttc acagaatgac tctcagttca caactacttg gaacaatcgt 40500
ggtccacagc cccactctcc aattcaacag gcctaggett caactgcacc tcccaccca 40560
ttcacattec ctattcttca tgaagaaggc ctctgtcagc ttgtcttgcc agtctccaga 40620
caagtctaga ggcattgcag aggggtgtaat ctctctccat ccctgttcta gaccttgtt 40680
aaagtgatat gagaagcctt acaaaggat taaaactga gctaacaacc acatttatat 40740
tagctgtat acagatttct tacttttttg tgaatattta aaaaatttta tcatacatat 40800

tttcataatt gagtgttgta actgatgaca atcctgggta atccaggata gaatcccat 40860
agttcatggt aaagcagtt gaaaacgtaa atgccaacag gaggtcgtga tgacaataat 40920
tcaactgtat ttgcaagcag gcttcccagt tgggttactc aggggttgat agcaggggag 40980
tggaggagag acagatttta aaaaggggca tcatcggaag gagatggctg tcaggagaga 41040
aaatggcagg ccctcctgaa ctgagccagt cctagcttca ggcctccttg ttgaccttga 41100
ctggttattg accacctggc attgcttctg tagcagcagg tagggtgaga tgtgggaaga 41160
agttgggatg acctcctgaa tgacagatta ccaactgtcc agctactgcc caggggtcac 41220
cacatctca cattgtgtct cattctccaa gtctaattaa gcagcttcag gaacacagaa 41280
ctttgtctat tgcctctacc tgtttcactt aaaatcaggt gcccatgtat gtctctgtgt 41340
tacactgtga ctgatcccta ataaaattag agattttcaa tctttgcact tgatattgcc 41400
aactcaccta agcaaattaa tgaggcttg agtaggcctc agagcctggg gctgtgaatg 41460
atggaagcca cacaagtctc agggacaggc cagtagaatt tcattgtctt ctactgaga 41520
agtgcacca aatcattgaa acctttttt ttatacttta ttctctgtat tggaaaatgg 41580
cagatatttg ctcttctctg tgttagagat attcatcttc aacatcacat acataacaac 41640
cttctaaaa caaacctga aaacatgagg ggcacggaaa gctttgtgac tcccaggaca 41700

117

gctgatgtag ctgcatcttg tgtgacattt atcactactg ttgtgtggag gccacatgtt 41760
gccatagagt cctccattc ctccaatgca tggaccttat gctcagtcct gagggagaca 41820
gtcatgaatc caacccagcc ccagaaaccc agcttcaggc aagttttggc tcagaaagaa 41880
aatgaagatt tgtctcccc ttgaaaattg aaagtaaatg aggcaacttt cactatctta 41940
aaccaaaatt ggggcagaaa actactagag taagcagggc atggctcttc cagttaagca 42000
aaactacatg caaatcccag ctgcatcacc taatgagcca gtaaccagg taagtaactt 42060
ctctgagctt catttcctta cctataagat tgaggacagt gataactcgt tggtcagggt 42120
gttatggta agtgagcaat atgtaagcct tcttaaatga tgcttggcac atggcaatca 42180
atcaaaaaata tttattgtgc acctactaca tacattacaa actcagtaag ccatgtactg 42240
gattaatgtg attcactcaa attatttcat tccctttcac cctataattg ttaaagatac 42300
ttaggctttt tgtctccag ttttcagcac ctaactgaaa aaggagatca ctatccttg 42360
gatctggata aatccagact agcctgacag atccagaatc aactagagta actaatgtct 42420
tgtatttctt gagataatc ccatctcaaa tgacctttt tgtgattctt gtaagtagct 42480
ttgcacttgt catcaaccaa gtttccatct gacagagatt tattaagcac cttctacggg 42540

118

ccagacagat gccaggggtg gaggttgtac ccaggcttag tgcctgccag catgggcac 42600
cttttggtc tggaagcatg gctcatggag ccacatccca gctatcagcc ctgtggcagc 42660
atcacatca tcaaaggaac cctgcaattc atctttctaa atcccaattt gcaattctct 42720
aagctgcag aaaactgatg tcaactgtga gcctgactaa cttgaggatga aaagccaatc 42780
agtcatgtgc cagcaaccat gtaattgagc tgagaacagg ccaatcttta gttattgaaa 42840
cattttaaat acatttctta tttccactca gtattggacc atctggtctg aattttgcct 42900
cacatcacca ctagggggca ttttatgcc aactatattc tgcaatagtt tgggggttgt 42960
gttgggacac catcagcaca gtgtggtggg ggggtggtag ggagaatgct tcttaggctt 43020
agtgaatc cgatagactg gtaccgaaaa tagggatgaac agggatgaatt caagcatcac 43080
tctgaaaagg cagttagtta gttatcaccc ctcaaatgta catatgtagt ccacaaacct 43140
aaggaggag ataaaccaat ttttattgca tatctactat gtaacaggca ctgagctaaa 43200
aatctccatc ttcattctct tatctaccca tcacaactat cctgagatag gttttgtctt 43260
catctcatt ttacaaataa gaggtcagag aggttatcac ttacaaccta tcacacatcc 43320
agcaagtage aaaaactgag tccaggtcag gttgctttca aagcctatca actttctgct 43380
cacaggctc acctagtgt gatattctca ctctctgaa attgtttctt cagtccecat 43440

taccatgact ctccagatta tcttgggatt tgtgtgtgtc tctgtgtgcc tgtgggtggg 43500
gagggggaca tgcacgcata atacggctgc gaataaagga gcaagcagct gagtgtttc 43560
atacttaatg acccttgtac tagtcagtga aacaggattt aaatttgact gagtataact 43620
tacacactct acctgtttta ttctcttgta gcaccaacgc cttacactgt gtctggcata 43680
gagtaggaaa ttaatagatg ttagatgaat tcataaacag ataaatcaac atggctctta 43740
ggaagacccc aaaagcattt gcccgaggag gcttcctatg tctggaagtg ttctgaagcc 43800
tatgaagtaa ggtgagatta tcttccaaca gaaaactcca aaagatgtgg aggtggggag 43860
ggtttgattt ataggatttg ctacagctgc cctagagaca tcagccaatc aaaggaaaat 43920
agactccaac ctgtttacag agctctctcg acttaccatc ccaaagcata gtccaagaac 43980
aaaagcccag tccaagggat cactgactca ccagcccctg ggaatgattt ccaattcact 44040
gatacatcaa accaggggtga tttgatatgc agtgtttgtc actctgaact tccaacaatg 44100
cagatctgag ccccgaggact actttgaaaa gactggatcc cttggctcgg attgtactct 44160
acaaagatga agaaggcagc cattttctgc ccactgggga ccagaagcct cttccattag 44220
gcagaaaactt catttctgga aatgtgaact ttgtgccag agtcatcaat gccgacgctc 44280

tatgtgaaaa gcagaccatt tactcacttc agcattgatt ttctggaaac atggcctgcc 44340
tgtatttata tgaggaaagg agaacatgaa agagagatat agtctgaaaa tgtaacgttg 44400
acttccaatg caaaactacc ctgagttcac tgattttatt ctcttctctt ttccaattct 44460
catccaaaag gctatcagaa tgtaatttca gttgaaaagg cttccatctc agaagtagaa 44520

119

120

aatagggag gtcgatgact tccctattcc cttccacctg ctggaaaact ggaggaaatgc 44580
 ccacaagggtg tagagtaggt aagacattct gagggagggg ccaacagatt cgtctgctct 44640
 ctgacaggaa gtaaaggcct tcctggggag gtcagtagag aagagaccag cccagggga 44700
 ttccactcct cagagtccat ccactgagge tggggccatc tccagtgage aaatttctgt 44760
 gggagggtta ctgaatgctg cagacctcac aaaaaggat tttggccagt gccttctccc 44820
 agctaaagga gtgtggacag ctggctaagt aaaaattggg cgaggccatg gatgtgcca 44880
 gtgaagacag agcctcagta aggaaaacag tcctgtatct actatcttcc tcacattcca 44940
 cccttgctc cttctttggc tgcctccaga cattgttctc acctctccca ccatggagac 45000
 gtggatttct gatctggcaa agaaacatca caagtgttt aacttttctc ttccttcttc 45060
 atccaagaat gaaagttaa cagagaccaa tacagttctg gacaagtga agaaataaac 45120
 catccccag caccatccag gctcagaaa aatgctggat atgatacaag gctttgcaat 45180

tcttttttt ttttttttt ttttttgaca gagtctcatt ctatctccag gctggagtgc 45240
 agtggcgcca tctcagctca ctgcaacctc cgcctcccg gttcaagcga ttctcctggc 45300
 tcagcctccc gagtagctgg gactacaagc acgcaccacc acgaccagct aattgcaatt 45360
 tttaaagaag aaattgcttt aaggcattaa catgcttctc tttatgaaac agatccccta 45420
 aaagaaacag gagtaaatct tggaaaatct cttacttgta ttctcagcag agcttgaag 45480
 gacattgcat taagaaaagg gacacagtgg cggggcgcg tggctcacat ctgtaatctc 45540
 agcactttgg gagggccagg aggggtggatc atgaggtcag gagatcgaga ccatcttggc 45600
 taacacagtg aaaccccgct tctactaaaa atacaaaaa ttagctgggc atgggtggg 45660
 ttgctcgag tcccatctac tggggaggct gaggcaggag aatggcgtga acccggcagg 45720
 cggagcttgc agtgagccga gattgcgcca ctgcactcca gcctgggtga cagaactaga 45780
 ctctgtctca aaaaaagaa aaaagaaaa aaaaagaaat tcttataaac ttcactgtaa 45840
 acaatggaaa gcagaatatg atctcccgaa aagagaagta tggtatacta gaatatgcta 45900
 ataacttaaa ttttaaatc acagattatt ttaacagaac ctgggggttg ggaataaaa 45960
 tagtttttaa gcctcttaat taattttatt tctcagtgtg aagtcaaatt tgaatgatt 46020

ttaattggtta cttaaaaatt aagcattcaa tgtcttaaat tttttaagt taacatgcga 46080
 taaaagagaa taactgtttc aaattactag tgaacaaatt aaaataaaaa cacaatgac 46140
 aaagaaaata tttttaagt acaaaaacaa actttaaaaa ccttgtaaga tcttacatat 46200
 cagttacaca ataaattaca atgaatcagt gtcattatta aaaatagact gtcagtttaa 46260
 gtcaaaaaca aaaattatat tctacttaca ggagaaatac ttggtagcaa atgaacaac 46320
 atagttagaa atatatagat aaacaaagat ataccattaa aatagaaata tgattcaatc 46380
 aagtatggca aaattaatat taggaaatag ttcaaggcaa aaagagttat gaaagaaaag 46440
 aacagtaagc ctcacttat catccgagt ttttgataag ttctcgaaa ctgtgacttt 46500
 aagcgaaact acatataata aaaccagtga tttttcttt tcttatcaat ggcataatgt 46560
 tgaaggaaat gatgttattc tgggcctgct agttcgtttc acttaagtc acagtttcca 46620
 agaacctatt gatgatgata agtgaggact tactgtaagt tatgtaattg aagatgaaat 46680
 agacataaaa tcacaagcca aataaaaata tttcattaaa atgtgtaaac aaaaattatt 46740
 agtaataaaa ggtaaacttt aaaattagta tagaatcat ttaataata atatgcaaca 46800
 gttttattta taagtataaa ctgaaatggt gctactacta gttagaaata aactaatcct 46860
 aatactaaat acaaaatggt aaaattgac acaaatgaga taaaaaatat caaaaattga 46920

tcttatctag ataattcatc aacagtataa aaataattgc agaaatgtta tgtaaagaat 46980
 tgcatagcaa atatttaca agtcacatg atatgacct aatagataaa ccaccagaga 47040
 aaaccttatt gatattatgc ataacaagaa tgccttctat catattataa cctcatcatt 47100
 gttctgaaac ttctaacc aaacaaaaa tgggaaatat aaataatctt tgaaagtcgg 47160
 aaagaaaatt atttgccatt gatatgataa tctccactaa aaatacaaaa gacttaatga 47220
 aatgacaatt aagattagt aaacaattta tatcttggt ggcttcaaag tacatatatg 47280
 aaagtaagtt atttttatat aaaccaacat taccagttta gagaataca atgggtgtaa 47340

121

tgaaatatgt catttaaaat agaaatttta aaatataaaa cacttaggaa taaaaaatgt 47400
 gaagaaaact gtaaagctac ccagaaccac taaagagagc atcatggcat atcctagtca 47460
 agtttaagat ttgtttctcc catgtcccag catttccata cctagaatat gtactagaga 47520
 aaaaaagtac ggtaccctat agcattgttt ctgatatgctt caaactggaa accacccaac 47580
 tgtctatcaa atacatgaga tcaataaate gcagcatagt cacaccatgg agtactatat 47640
 aggaataaaa atgaaaaacc tgcagctctt tgcaatcaca agaacgaata ttgcaatcat 47700
 aaaccaaaga gtcaagacaa aagaacaca tagcataaaa ctactctata aagctggaaa 47760

122

acaggcagca ctctttttgg atgcatgtat aagtggtaac agtaaatatt aaataagtag 47820
 aaatcagggt agaggtaatt tctagaagag acagaataga gttttacatg gggcacagga 47880
 agggtttct ggtgttgata aaggtttttt ttttttttaa tgatgttggt aataattata 47940
 tgggttttta ctctatgatt actaagtaat gtgtatgtat atatatgtg cactttttat 48000
 gtgtatatt ttgtgtcagg cagatcgtct gcatagtcct aaactcttga tttcttcac 48060
 ttcttgacac aatcctttgg gaccctttca gctcttcatt ctgtaggctc aagttctgcc 48120
 ctgcctccat ccccagacca agtcccaacc tgaggagagag ctgggtctca atcttccctt 48180
 tactaggatg ggaaatgcca acattctttt tggttacca ttcctggagg atggttcacg 48240
 ctggcagggg ccatagaaga ttgatgcaca gctgtatttt cctgtcattt tgggcacagg 48300
 ggtgaggatg gaactttgcc ccttgacag ttttagctcc agtcaactgc tgttaacttt 48360
 gacctcagga cacccttcac cctacatcca tgaacatgtt gcaacatcag gcaactacaa 48420
 ggtaaagtag ggtatgcagg gccttggtga ttcagtttct tctcccaggt ggatgaacag 48480
 cagcagcgga agagatagat agcacctctt ttccagctgg atagtgtgt gaaacacttc 48540
 ctcagcctcc tagcagtgc aaagacatgt aggggtggcct tagccagaaa ggtgaggcca 48600
 tcccagctc cagcatgggg ttgcggaagt agatataggt gaccactag agctgtgaac 48660

tcctttaact ctagegttga agtgccatat tcaatgagca cagttctgga aaggtctcca 48720
 gggaccccat atcacatcat gaactaacc aaacctctaa atcccctaaa tctttcaaag 48780
 ctgagagaga gagagagaga gtaattcacc tttagggtat gatatagact gggctatgat 48840
 attttgagcc cactcactgg gaaccatgga tagggtgatt atataattga ctatccaacc 48900
 aaagacactt ttgagagag aaagggaat ttaataaatt atcttgggac agcagttgac 48960
 aactaggact atcctaggca aaccaggtta cataattacc ctagccatgg accatacttt 49020
 gagaagcaat ttccaaaggc ctctgccatg tgcagctgct catagccaag ctcatgctac 49080
 acaggtggaa aagcttctgg aaaattgggg tgettcccta gaagactcag aatgttaaca 49140
 aggaataggg aagaaagaga actactgaag agcttggcac aggagggtg gcccagaacc 49200
 tgtgtcacag cactgccctg ggccattcac accaaagctc attccagaga ctgaaagtat 49260
 ttgatggcct tctgtcatac cttacctgcc aggccacctg cttgatgggc tctttcctga 49320
 acctagacac ccccaggcca ccatcgtcct ccctgataga atattatatt agaacaattt 49380
 gaggaacata gacacattat ccccaacct gtcctcaac tgtttcatct gtcagacca 49440
 tgggtgtcagt gagaccttct gatggagact tccaagccac ctggctgctt aggttagtct 49500

gcaagtgtt ccagtgtttt ttaagagagg tcctccaaat tcaaatcact tgtttatgtc 49560
 ccactgtctg cacaccacct gaatgggaag tgtcagtcta cgacatcaa ggcctctcct 49620
 gctgtgtctg ctactgacag cactgttgct catctatctc aaatgggaga attctcttac 49680
 aaaaactcac tccctccact cagtacggct ctttgcataa caattagttt ttattcttga 49740
 tgettatac cccatttcaa gactgctaga gaaatgagtt atgcaggata tgaccctct 49800
 agtcatcaaa gaaccagaga aaaagtgtgt ggcttgaagc tgagcaaga tgetgcctcc 49860
 aagtgggaag tgacatatgt atgctggaca cgatatatct gcagagctct ccaacctgt 49920
 catectccca ctctagttgt acagccctca tcctcccccc acatcaccac aatgcctatc 49980
 ctcatttcca cagttctgca gtcccaaggc cctgacctcc acctaggatc tcagaaactg 50040
 atctgtaaat ccaggatgga gaccctaaat atcagattga taaagtgtag gactcatgaa 50100
 gatgtcctata aaaaatttct tagaaggcca ggtgcgggtg ctcacacct taatcccagc 50160

123

124

actttgggag gctgaggcag gtggatcact aggtcaggag attgagacca tcctggctaa 50220
 cacgggtgaaa ccctgtgtct actaaaaaat acaaaaaaaa attcgccggg cgtggtggtg 50280
 ggtgcctgta gtcccagcta ctggggaggc tgaggcagga gaatggcatg aacctgggag 50340
 gcagagcttg cagtgaagta aggtcatgcc actgcactcc agcctgggtg acagagtga 50400

actctgtcac aaaaaaaaaa aaaatatttc ttagaaggac tgtcagattc atagcattct 50460
 cgcttttttc ttttttacta attaatcatt tatcttaate tgtttcatgc tgctatgaca 50520
 gaatacccaa gactgagtaa ttataaaga aaagtaattt atttctacag tgccagggtc 50580
 tgggaagggtg ctggtatctg gtgagggtt tcttgctgca tcattccatg gcagaaagt 50640
 agagggtgag agagggacaa gggaggggaa ctgaactcat tcctttatca gtaaccact 50700
 cctgcaataa ctaatccact ccacaataa caacattaat ctattcatga gggcacagcc 50760
 ttcattgacct agtcacttct taaagttct accttaacte cattgctttg gggattaaat 50820
 ttcaacatat aaaccttgg aggacacatt caaacacag aaacattctt cagtagaact 50880
 ttaatatattac tgtcttataa aattctgtca aatgaacaaa agataacca taattacacc 50940
 ctaatatgac tgcctttaac attttactgt atttcagcct ttttgctatg tatataattt 51000
 tacagagttg taatcatacc cagtatatga ttttatcatg ttttccact taccattata 51060
 ggtattttta atattgtac atagtcttca tggttgtcat tgtaatagc tatgctgtaa 51120
 tagttcactg aattgaagtg ctttatttac ttagctaccc tattatcttt aaacaatttc 51180
 taatttcttt ttataataaa catggacata tttctgacag ggggtgttctt tttcacatct 51240

tgacctactt ttcacatagt gttacaatta cctgacaaa gaatacaaac tttttgtctc 51300
 ttgacgtata tttccaaaag atttttaaaa ggtgcattaa tttactctgc agctgggtga 51360
 aatgaagacc atttgtcat tgtttcttg agagtagagc ttccaaaagt agggatatgt 51420
 ggctaggagg aagaaatcca gctggggca ggcattctgt aaagaactcc agttctcact 51480
 ggtacactgg ttttattttt ctctgtttct tgcagactga gcaattgata actctgtggg 51540
 tcctctttgt ttttaccatt gttgaaact ccgttgtgct ttttccaca tggaggagaa 51600
 agaagaagtc aagaatgacc ttctttgtga ctgagctggc catcacaggt aagtaactat 51660
 gcaagtgaga ggcaggaagc tatatgtgaa gtccctatgg cttcctgctt ttaatgaatt 51720
 ttatcaaaaa aaaaaaatg taacgcacgc gtcaatttgg gaataatttc tgaaagaata 51780
 taaaacctat atttgaatat ttctctggc atacttaaca catatgaatg cctctaagat 51840
 ttcattataa agtaactca ctacactaat ggaaatatca ttatcagtat caccaaatgg 51900
 ttctataggg tttccctgtt ttatacaca gtagcctcca tagttcacta agtgatatt 51960
 accatatcat cctgcattat aagcttaagg aatacatccc agaaaatgta ccagcactat 52020
 ctctattaaa ttattaatgt taagtcttga gtactttgca gattaaagcc tgtggacatt 52080
 gcttttgaaa tgcaaatgat gtgtaacacc actactgggg gtagtataat gaagtaatat 52140

aatctcaagg atcgggatgc ttaagtgtag actttggaaa tgaccattca gtagaagagt 52200
 gagcacagca cacctagtag aggaatgggtg aaatatcttc aaggagaaa atgatctgtg 52260
 aaagttaggg ccccaaagac atgagtagag ctcatgttca aaaggaaaag aaaaacacaa 52320
 ccagggaag agtcctgttc tacaggccag aaagaaagt agaaaatgag attcacagaa 52380
 ggtccagcat aagccacact tggagtctta agctctggga gcaagatggc tgttatatta 52440
 gcttaatttg gatcagacta tagaaaaaa aatgcaaaag gaaaaattta aatattaaat 52500
 gcttacaagg agtgacggca aatgacttcc agaaagggt atttggtaca tttcaacctg 52560
 tactgttate tcagctgtag taatggtagt ggagctcttt agaatttagt cttgagccat 52620
 aatatttcaa aaatttatga cactgttaact tacaagagaa tcttagccat acattgttag 52680
 taacctgaaa ttcccttttt tctttctaac aaagtataac aagccacact gcttgagctg 52740
 ggctgcagtg gccagggtta acatccaagg caccagtga aaatacagag aaggtaaaag 52800
 gagcaagagt tctgaagatg gaacctggga tgggggaaag tttcttcaat ctttccatcc 52860
 aacaagaact ccaatttttc actcctataa ccgtagaagt agaggttaatt aggatcatcc 52920
 agcaaatgct tagaggcaaa tatccctgga tgaggatgcc acagcttatt ttcattatat 52980

ttcttcgatt acagtgtggt aatgcattgt gtatggaact acatattctt tcagaatgaa 53040
 aggatttaga ggtggcaaga atatcagctt gaaatttaaa gttttttcat aaacaataaa 53100
 caaatgataa ttgaaaattc actacatatt atcaaagaca aaagttgtat gttctaattc 53160
 atcatcgttg tattaatctg ggcttaattt catgtacatc tcctggacag tgtttttatt 53220
 tgtaattgt ttctagaaaa actctagggg tcaggtcaga agcattttta atgaagaatt 53280
 cctgaaatga aaaacattgc caaaggctta agactgaagc tcaatggctt gagattgaat 53340
 ttatatatta ttgaaatttc cttcatacac attttagcat gatcacagat cctttggtaa 53400
 aggaggtgag aatacatacc tgagtcttga gtatgcataa agaagttacc caggcatcaa 53460
 ctgaggggcc ctgtgctttg agacatatat aaaaatgtgg tttgagtcce ccatcatatg 53520
 tcaatgtcct ccttaagatt tcttcaaatt ctgtggaatt tatattttta cttctctttt 53580
 gcttccttct tctccttcc actaaattct tgcctctctt caccagtatc tcatctttct 53640
 gagctcctct ttttttgagg ttgtttcatg ctgtccctaa cgaggcactc aaagcaccct 53700
 cctttccttt attttcttta aaatcatcca caaaagtatg actttctttg tttaaaggac 53760
 ttttctgaat atttcaggta atataatgat attgtatcac agaaaagtaa atatcttaag 53820
 agcaaatatt tcattttctc agaacattca gctgacatca gaaatgttct attttgatca 53880

tgccactgca ctccagcctg ggagacagag tgagactcgc tctcaaaaaa aaaaaaaaaa 53940
 aaaaaaagat gtctcagttt taccttgctt cagctcact attctgctct ctcttctaaa 54000
 tgtctagtat cttgtgcaa aaaattttaa tactttctc tgtttttgtt ttgctttgtt 54060
 cttaccacta ccaaaccgtg atctcagaga ccccaact tccaaaaac aagtatcagg 54120
 cttttttttt ttttaacaaa ggaagtgtct ccctaaaaaa gaacctgga actagttaca 54180
 atgataaaca gacaaagaaa aatacacatt catatttata gttacatatg tcatggctaa 54240
 aaataaatta ttctaaattg tataaaacca taagatatac agtgataact caatagtatg 54300
 ttgtattagt ctgttctcac actgctatga agaaattctc gagactgggt aatttataaa 54360
 ggaaagaggt ttagttgact cagagttctg cattgctagg gagacctgag gaaacttatt 54420
 aatacaatca tggcagaagg caaaggagaa gcaggtaact tcttcacaag gcagcaagg 54480
 ggagtggagg caagcagggg gaatgccaga tgcttataaa acatcagatc ttgtgagact 54540
 cactcattat cacaacaaca gcatagggaa accgccctca tgatccaatt acctccacct 54600
 ggtcctgccc ttgacacatg ggggttatta caattcaagg tgagttttgg gtggggacat 54660
 agagtcaaac catatcatat attatgtgct gtgcttgcaa aaattttgaa gtggttttag 54720

gccaatacgc ctacctacaa taattagaaa agctggacaa aatttaaaca tttgttagaa 54780
 ggtatcacat agctgcaaaa gacaattaag acttgagggg ccaagatttc atagagcaga 54840
 aaattttatg agataaatac attatttgac accactatcc ctttaaagta ttagctgatt 54900
 taaaagcaga aactggaagg ctgaaaacct gagtagagct ttgggcagtt tcaactggact 54960
 gatggggcaa aaattaattt gccaaagcat actggctttg ataaacattc cagggtttcc 55020
 attggtactg ctgaaaagat acaacctaca agtaagagtg aactaaaaat ggatcagccc 55080
 tcacaaaaaa attaaataca acccaaaacc tgaatgaaat cagatgatct acctctgcat 55140
 gcacacaaac catctgccag tgcaaaaata aatcttcttt ggaggaagaa ggcattatcc 55200
 catcatcaaa ttaactataa tttccatgc acaacgttca gcaettgatt aaaaaataac 55260
 cagggaaggca acaatacaat aattgatgaa aaacgaggag aaaaatagat aacgaagagt 55320
 tgcacaagag atccatctat tggcattatc aagatacaga atttataact gttgctcatc 55380
 tgtttagaag ctacaaaata agattgaagg ttgaatgtcc tatctccagg cttttggtgc 55440
 acctgcccc ttaacagtgg agcttgagca cacaaagaac tccctttcca cacaaagaac 55500
 ttggtgtagt ggcagttcct ccaactccaca cctggatgta attccagcca tttaacacac 55560
 ctgccccaat ggactaggag tttgagccac ctcttctctc catgcaaaga ccttggtgct 55620

gcagtttctc tgccttttcc ccagacatat caccacactc gaggtgcacc tgcctctcca 55680
 gatcaggagc ttgagctact cctacattcc ccaggaaaac tttgtggcag tagtggctc 55740

127

128

tctccacctt gctggggcat atttccaggc atttgacaca cctgattgtc taaattagaa 55800
 gcatgacctg cccctccgtg cagagatctt ggtagagcaa agctctctgc actcgatgcc 55860
 cagacatatt tccaggcatt tgaagcacca actcttctag attaggaatt taagcttccc 55920
 ccacttcctg tgcagagaac ttgggacagt ggaggtttcc agactctatg cctaggcaca 55980
 tctccaggca cttggcagct gccaccaga ccctgcctca gagctaattgc ttctgcctgc 56040
 cattgggaga actgtaggag agcttgctta gtctagccca cccatcttgg cccccactcc 56100
 agaactaage agggagctca gaccactgtg catttcacag atcagcccat tgcccaagtc 56160
 agcagaactt ctcccagtaa acaagaatca agtatatate catttgagtc agctgcagct 56220
 gaactttatc cataagcttc acctactggc ctggagggtg aactgcacaa tacaataaga 56280
 aatctggggc caggcacagt ggctcacgcc tgtaatccca gcactttggg aggccaagtc 56340
 gggcagatca caaggtcagg agatcgagac catctggct aatacgggtga taccgggtt 56400
 ctactaaaaa tgcaaaaaat tagctgggtg tgggtggtga cgcctgtagt cacagctact 56460

cgaggaggctg aggcaggaga atggcatgac cccaggaggt ggagcttgca gtgagccgag 56520
 attgtgccac tgcactccag cctggatgac agagccagac tctgtctcaa aaaaaaaaaa 56580
 aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaagaaaaga aagaaagaaa tctaggcagg gcatgggtgtg 56640
 ttatgcctgt agtcccagca ctttgggatg ctaaggccgg caaatcactt gagcttagga 56700
 attcgtaac aacctgggca acatagttag acccccatct ctgcaaaaaa ttttttaaat 56760
 tagccaggca tgggtgatgca cacctgtagt cccagtgtcc agggaggctg aggtgggaga 56820
 attattggtg ccagaaggt caaggcagca gtgagccaag atcatgccac tgcactccca 56880
 tctgggtaac aaagtgggac cctgtctcta aaaaaatta aaaaaaaaaa aaggaaaaga 56940
 aaagaaatct gatgacataa ctgcacagca ctggaaaatg taataagcct cctgagacct 57000
 ctgccacca gccttatagg aggcagttag cctcctcaca taccagtag acgctacta 57060
 caaccagcat ttgggaaagc caccatacaa agactacca ttaccaagaa acgcttatac 57120
 agactcgtt ccactgaaag caccagaac caaatccaa ggaccttaca caacataaac 57180
 tatagacatc tctcagatg aggaaaaaag tcacatccaa ataaaagcaa atttaaaaaa 57240
 aaataagaag agatagctta tctggatgag aaggaaccag agaaataact cggaatgtat 57300
 gaataaaata gagtgtaca acaccccaa aggatcacac taactctcca gtaatggatt 57360

ctaaccaaga tgaaatattt gaaatatcag gtaaagagct caaatattg atttttaa 57420
 agtcaatga gatccaagaa aaattgaaa accaacacaa agaaaacaat tcaggacatg 57480
 caagaagaga tagataccac taaaataaaa gaaacggaca tttaaaaatt attgaaggaa 57540
 aaacaaaata aaagtgaag cttcaacaat aggctagacc aagtgaaga aagactttca 57600
 gaactagaag acatcttttg aattaaacca gtaagaaaaa tatacagaaa aatgaattt 57660
 aagaaatgcc tagtgcttt gataaatacg ggattatgta aagcacccaa acctacaatt 57720
 tataggtatt tcaaagggtg aagaagaaaa agtatggaaa acctatttga ggaataatt 57780
 cagaaaaagct tctttggtt tgggagagat ttagaaacc agatacaaga aactcaaaaa 57840
 actcctagaa gacacatcgt gagaagaaca tcaccaagac gtatagtcac cagactatcc 57900
 aaagtcaaca tgaaggaaaa aatcctaaga gtgccagag agaagtgtc atcacctat 57960
 aaaggaaatt tcataagact aatagtggac ttctcagcag aaacctaca tgccagaaga 58020
 gatcaggggc ctatttttag cctccttaaa gaacaaatgt gccagccaag attttcacat 58080
 cctgccatgc taagctttat aaatgaagaa gaaatcaagt cttaaccaga caaataaatg 58140
 ctaagggaat ttgtcaatac tagaccagac ttacaagata tgctcaaagg agttctaac 58200

atggaaacaa aagaacaata ctcatcatca taaaaggaca cacagataca aagctcacag 58260
 atcctgtaaa ccaacaacac aattgaaact ccaagtaaca acactgtgac aggaacacaa 58320
 cctcacatat taatattaat cttgaatgca aatggcctaa atattccact taaaatatag 58380
 agtggaaaat tggattaaaa agagactcaa ctatctgcta cctacaagat atccacttac 58440
 tgactaaaga cagctataga ctcaaagtaa aggggtggga aaatatatat catgcaaatg 58500
 ggaaaaaaag caagcaggag tagccattct tatattagat aaacagaca tcaaacacc 58560

129

aacaataaaa aaacaagaca aagaatggca tcatataatg ataaaaggtt caaacgacaa 58620
 gaagattgaa ctattgtaaa gtatacacga ccaacactgg agagcccaga ttacaaaaaa 58680
 ttacgactac atataagaac aaagatgaat agaaaaaaaa tagtggtctt caatactcca 58740
 ctgacatcag tagacagatc atcaaggcag gaaatcaaca aaaaatctct ggacttattc 58800
 tgggtacagt aactgactct tgtaatccca gcactttgag gggctgaggt ggtaggattg 58860
 tttgaggcca gttgttcaag accagcttgg gcaatatact gagaccaat tccacaaaat 58920
 aaataaatga ataaataaat aaaaattaat taagcatagt agcacatgcc tgtagtctaa 58980
 gcaacttgca aggctgagct ggaaggattg tgtgagtgcg ggagtttgag gttacagtaa 59040
 gcaccactgc aatccagcct gggcaaaaaga gtgagaccct gtctcctaaa aaaacaaaac 59100

130

aaaacgaaac aaaataaaaa gaaagaaaga aactctggac ttaaactata tatagaccaa 59160
 atggacctaa tagacattta tagaacattt catttaataa ctgtaaaaata tacattcttc 59220
 tcatctgtac atggaacatt ctcccaaatt gactttattc ttagccataa agcaattctc 59280
 aataaattaa aaaaaactga aatcatatca agtgttttct taaaccacag tggaataaaa 59340
 ttataaatca aaccaacggg cacttcaaaa aatacacaag aacatgaaaa ctaagcaatt 59400
 tgctcctgaa tggccttttg gtaacaata aaattaagac aaaaaataaa aacatttcaa 59460
 aatgaatgaa agtagagata caacatacca aaacctctgg gatatagtga aaacagtctc 59520
 aagagaaaaag tttatagaat tcaatgctta cactaaaaga tagaaagatt tcaaattaac 59580
 aacctaacat tacacctcta aggaacaagg aaagcgagaa caagccaaat ccaaagtaag 59640
 cagaaaaaaa agaaatataa taacaaagat cagagcacia tgacatgaga ttgagattta 59700
 aaaaaagata caaaaagtca acaaaaacaaa atgttggatc tttgaaaaga taaatgaaat 59760
 tggcagcctt ctagctagat gaaacaagaa acaggagaga tgattcaatt aagtacaatc 59820
 agaaatgata aagatgattg acatagtgtt gatgtgtgtc ctagaccaa tcgcatgttg 59880
 aaatacaatc ccccggtgtt ggaggtaggg cctggtggaa agtgattata tcatggaggc 59940

agatttttca ttaatgggtt aggaccatcc cccttgggca ccagcctact gccctcatga 60000
 tagtgaatga gcttttgtga gatctggtgt tgcaccccc tgctctctct ctcttgatc 60060
 ttctctggcc atgtgatgtg cctgctccct cttcgttttg cttccatta tgattgtaag 60120
 cttcttgagc ccctccaaga agccaagcag atgccagcat catacttctt gcacagcctg 60180
 cagaactatg agccaattaa acctcttttc tttataaatt acccagtcct agttacttct 60240
 ttatagcctt gtgagaatgg actaatgcag tgaaattaca actgatacta tagaaataaa 60300
 aaaaaatcat cagagatgac tatgaacacc tctgtgcaca caaactagaa aacctggagg 60360
 aaatggataa atcccagaaa catacaaccc cctaagattg aaccaggaaa gagtagaat 60420
 cctgaataga ccaatagcaa gtaataaaat cacatcagta ataaaaaatc ttccaacaaa 60480
 aaaaaatctc agaccagaca gattcacagc tgaattttat cagatgtaca aagaaaagct 60540
 ggtaccaatc ttactgaatc tattccaaaa catgaatgtg aagcaattcc taactgttcc 60600
 tataaaacca gtatcacctt gataccaaaa tcatacaagg acacaacaac aacaatacaa 60660
 aaaaaccac tacaggccaa taaccctgat ggacatagtt gcaaaatttc tcatcaagat 60720
 accagcaaac caaatccaac agcatgttaa aaagataata catcacaatc aagtgagttt 60780
 tattccatgg atgcaaggat gattcaacat atgcaaatca ataaatcaa tagacatgat 60840

tcaccacatt aacaaaacta aaaacaaaa ccatatgatc atctcaatac aataaggcgt 60900
 caataaaatc caacatcttt tgataataaa aacctcaac aaattaggca tctaaggaa 60960
 atacctcaaa ataagagcca tctattacaa acctacagcc aacattatac tgaatgagga 61020
 aaaaattgaaa gcattatccc taaaaactgg aacacaatga ggatgtccac attcaccact 61080
 cctattcaac atagcactga aagtcctagc tagagcaatc aggcaagaaa aagaaatgaa 61140
 aggaatccac actagaaaaa aaagtcaaat taccaaatta tctctgttca gtaatgacat 61200
 gactgtatac ttagaaaaa ctctacagac tccaaaagac tcttagactt aacaaacaac 61260
 ttcaataaat tticaggata caaatcaac atataaaaat cagtagcatg tctatacacc 61320
 agtagtcttc aggtgagaa ccaaatcaag aacttgatct taacaatagc cacaaaaaat 61380

131

132

aaaataaaat aaaataataa aacacctagg aatactttta accaaggaga tgaatatct 61440
 ctacaaggac aactacaaaa agtgatgaaa gaaattgtag ataacacaca tgactggaaa 61500
 aacatcccat gctcatggat tggaaaattt aatatcatta aaatgaccat acttcccaaa 61560
 gcaatctaca gattcaacac aatccctatc atattacaaa tgccattttt cagagaatta 61620
 gtaaaacaag attaaagttt atatagaatt ttaaaagacc ctgaatagcc aaagtaattc 61680

ttttcttttt ttgaaatgga gtctcgtct gtcaccaggc tggagtgcac tggcacgac 61740
 ttggctcact gcaacctaca cctcctgggt tcaagagatt ctctgcctc agcctcctga 61800
 gtagctggga ctacaggtgc gcatcaccat gccagctaa tttttgtatt tttagtagag 61860
 acgggggttt accatgttgg ccaggatggt cttgatctct tgaccttgtg atctgccagc 61920
 ctacgctct caaagtgtg ggattacagg tgtgaaccac cgtgcctagc atagccaaag 61980
 taattctaag caaaagaaaa aatccagagg caccacattg cctgacttta tacaacaagg 62040
 ctgtagtaac taaaacagca tgatactggt acaaaaatag acacacagat caatgaaaca 62100
 gaatagagaa agcagttaaa atgccacata cctgcaacca acccatcttt aacaaagctg 62160
 acaaaaaata acaatatgga aaggacacct tattcaataa atgggtctgg gaaaattggc 62220
 tagccatatg cagaagaatg aaacctacc tatgacaata tacaacatt aactcaagat 62280
 agatcaaaga cttaaatgta agatctgaaa ctaaaaatct tagggaaaaa aacctgggaa 62340
 aactctactg gacattagac taggcaaaga atttatgaca aagaccccca aaacaaatgg 62400
 aacagaaaca aaaataggca agtgggaactt atttaatta aaaagcttct gtacaacaaa 62460
 agaaataatc acaaataga cagcctattt ggagaggag tatttgcaga ttatttctcc 62520
 aacaaatgac taatatccaa aatatacaag gaactaagac aaatcaacaa gaaagaacaa 62580

acaaccccat taaaaactgg gcaaaagaca tgaacagaca tttctcaaaa ttgaaatac 62640
 tagcagccaa caaacacatg aaaaaaggct caatatcact aatcatcaga gaaattaaaa 62700
 gtaataccac aatgagatat catcttacac cagtcagaat ggctattatt aaaaaatcaa 62760
 aaaacaatag atgctggcaa ggctgtgaag aaaagggtag acttacacac ttttgaggga 62820
 atgtaaatta gttcaaccac tatagaaaac agtatagaga tttctcagaa gacttgaaac 62880
 agatcttcca tttcaccaag caatctcact actgagtatc taccacaaagg aaatgaaatc 62940
 actatataaa aaagacattt gccctcatat gttcattgca gcactattca cactagcaaa 63000
 gtcaggcaat gaagctcagt ctccagcaat ggttgatttg ataaaaaaaa aaaaaaaa 63060
 aactgcggtat tatatacacc atagaatact atgcagctat aaaaaagaat gaaatcatgt 63120
 cctttacaga aacatagata aagctagaag ccattatact aagtaaaaa actcagaagc 63180
 aaataaaaa acatatgttc tccttcataa gggggagcta aatatccatc catagataaa 63240
 aagatggaaa taatagacac tagggactcc aaaagagaga aagggtgggag gtgaataaga 63300
 gttgaaaagt tacctattgg ttacagtgtt cactatttag gtaatgggta cactggaatc 63360
 acaatctcca ctagttacaa tatgttacia tacacctgtg tattacaata tgctgtgtga 63420

aaaaactgca cacatatgcc tggaatctaa aattttaaaa taatgaagat tgaatgtcct 63480
 agaaaggaat aaacaaaaac atttaggaac tgacaattac aactgaagct tacaatacaa 63540
 tagttaaact tagcgcaaaa ttaaatgtag ctaaaaga aatcattgaa ctggaatata 63600
 ggtccaaaga aaataattag attgaagcat gaaaaagaa aggacaaaa atacaaaaag 63660
 aaaataaaaa gcatatggaa gtagtgaaaa ggactccag aaaaagataa agcccagact 63720
 ggatagaaac aacacttata gtggccaata attttccaa actcttttaa gacatcaaaa 63780
 cacaataca taaagacca taaaggacaa cagcaagcaa acaacaaat ataaagagaa 63840
 ttaaacaca tgaatgata agactaagta aaagcccat aatcttgaat ttgaaatgaa 63900
 aatatttatg ctagctcatg atgtatttta tgcttcagga gtttttaagg atacatacca 63960
 aaatgtttat aggtaaactg ataacatgtc tgggatttac ttcaaaataa tttgaggctg 64020
 ggggtgggtt gagatgtata gatgtacaaa attgatattg ataactgttg gaggttggtg 64080
 gtgagtacat tggattcttt atttttttta tactattctc tctactttta tgtaagtta 64140
 agattttttt cataataaaa ttcaaaacaa aattatgcat gattataatg aaacaaaata 64200

aagagatctg ggtagttaaa gatgttaaag tccttggatt gcctggatgt agtaaaagta 64260
ctaatttcta ttagatttta atgtcaagga ggtgtgttaa aatctctaaa gtaatcctcc 64320

caaattatga aaactgacat tactagcaag ctaaagaagg tataaaatgc agtatttgaa 64380
tatgcaaata tatatgttta tatatagagt tattccccag tatccatgga ggattagttc 64440
cagaatcccc tgccaatata aaaattcgag gatgcttaag tcccttcat aaaatagata 64500
gtatttgcac ataacctata tacaccctcc tgtatacttt aagtcacctc taaattactt 64560
ataatttcta atgcaatgta aattctatat aaaaattttt atactatatt cttaaaattt 64620
gtatcatttt attattgtat tgttatttta tactttctta atatttttaa tctgcagttg 64680
atagaatcca tggatgtgga acccacagat aaaaagggcc aattataata catacatatt 64740
atataaaatc aatctaagtt aagacaggag agaaaaata ttagaattat tagaacaagt 64800
aagaagaata ggccagtaca cttaacctca aatgtatcag taattgcatt aattgtaaat 64860
ggactaaata ttcccattaa aataacaaga ttgtcagagt agatttttaa attacctatt 64920
ttaatttggt tataaaagggt gtacaccata aataaaatga tgcaggttaa aattaaaagg 64980
aaaaggatgg taaagtaaaa tgataaaaaa taatgaaaca aaacaaaaca caaagtaaaa 65040
gtaagccaat gcagctacac atgtgtatca aaagtttata aatttgcgtg gattcttgga 65100
atcacttgta gctttatctg tgtcttagaa tttgcttga aaggaatata aagacaggag 65160

ggcttctaaa gctagtaatg ttctatttct tgatcttgct ttaggttacg tgggcgtggt 65220
cctcttgtaa taattcacca aattatatac ttatgatttt gtatactttt ctttatgtgt 65280
tttatttcaa tacaaagttt atttacaata tatatcacat taatccaggg cagggttgct 65340
aatctcaaat ggcttttaga atcaagcagg caatgaatgt aaacatgtaa aagagccaag 65400
gggaagagac agaataaaaa cagagataaa aaccagagaa tgaatgccct gcctaaagac 65460
attaaaatca atttttgtca aacactgtgc tgatcaaaaca aatcacacat gcaggccaga 65520
tttgaccaa gggtagcttt cttacaacaa ctgatataa aaatttaaac atcagaattt 65580
gaaaagtgtg ccactataaa attctagccc acctctgaag tatgaacca ccttcaattt 65640
gtgaggtaga atattaatct ttactgggtg attgtgagaa gtgaggccaa gaagttgggg 65700
aggttaacat ttacaatggt ttagacaaat catatgtttg acaaggttta aaatcccttc 65760
tgttcaaaga atatcttata ttaggatttt cttctcctaa tgtgtttatt attgttttta 65820
ttagtataat ttttaaagaa atctgaacta ttgcagcct cagagaccat aacagtgaga 65880
acaaaaatat aaaggaaaat tttcaaatga tggaaagtgt aacccatata acccgaaatc 65940
ttcatgattt tcagatgacc atctgattaa ggagaaaagt caagataagc acatattcat 66000
atctgcttat ttctagaatt gttctatcag aagaccatga attggtcata tgaggggaag 66060

aaacactgac atgatactgg ctctattagg atgatattaa aagaggctgc tggctcaagc 66120
ttagcatgga tgagttgttc tcacataaag atgctgttat tgaccagggtg tgggtggtca 66180
cgcctataat cccagcactt tgggaggctt tgggtagtag atcccctgtg tccaggagtt 66240
caagaccagc ctgagcaaca tagtgagacc ctgtctctac taaaaaattt tttaaattaa 66300
aagttaaaaa attaaatgat gttgctattg ttaatgcatt cctgcaatgc taacatgctt 66360
tcataaatat acttatgatt ttataggtgt ttctctctta gcctcaagaa gggagatggt 66420
ttagtctagg gactgtcata acaaaataat ataaactgtg tggctcaaac aacagaaatt 66480
tatttctctg cagtcctgta ggtgaaagt ttaacattag ggtgccagca tgggtgtggt 66540
ctcttctctg gttgcagatg tcaccgtctc actgcatcct catgtggcct ttgtgcaatg 66600
cctctgcaca aagagagaga aacagcaagt tatgtgccgt ctcttctgt aggtcacta 66660
atcctatgga atcagggcc cacccttgtt aaccttaatt attccacag aggtcatatg 66720
ttcaaatata gtcacattgg gagttagaga ttcaacatat aaattttagg ggaatacaaa 66780
ccttcagtct gtaacaggga acagagggtc tagaagaaat gtagtagtag caaaagggtg 66840
ggtggggaga taataggagc ttcatatgtc ttgctaagaa gttcaggctt tgccttttagc 66900

acagccctc ttctgctagc tttgttcagg ccaccatcac ctttgatgca gattactaca 66960

135

136

aaagccaccc aaggtgtatg aaatgagaaa acacatactt aaattaaccc atggccagggt 67020
 tttgctggta acttggaac acagtaaggg aaggaaaata actttgttgt ggagagggca 67080
 aaccaaggaa ggtcagaaag acatagagac agtggagct caaggaaccg gaggttgtcc 67140
 caaagtcata aggcggatgt aacgagagca ccagaacaac agagctggaa ggaagggaag 67200
 aaggaaggat atgttttagaa agcaagatgt tcccagatga atactgcaga ggtagtataa 67260
 ctcaagtcaa cgattgtact gggtaggcaa ggtagggtgg cagggaagt cactagcaaa 67320
 catggccaca ataattgaaa cttaactttg tgtttacat gcaccaggct ctgtgtaca 67380
 tgccttctgt agatcatctc atttaactct cacacagga ttttaagcctg aagttttttt 67440
 cagagaagac atacaaatcc caagtaagag catgaaaaga tgttcattag cattagtcatt 67500
 tagaggaaat gcaaatccaa agatcaggga gatacgactt cacaccttca agaattggta 67560
 ttcccctata aaataatata cttaactact ctttgaaaca taacattttc cacaactca 67620
 cctctttgaa ttcacatttt gctttgccag tgttttatgt tattcagaca tgagtttgaa 67680
 tctcagcatt tctactctct agccctatga cctatgaaaa gtgacaattt ctctgaatat 67740
 caatttccca atccaaaaaa tgggaatacc tcttgagatt gtggtgagga ttaataaga 67800

taatgaatat aaagtgccta gtatagtaag aggcataatta ttgttcaata aatgctagct 67860
 gtgaatgcta ctgctatagt tatttcattc actgtagaaa tgattaattt aaactcctc 67920
 aagtaactta cttaagagtg aaagtctcc aaaaggcttg aatttcactg caaacctctt 67980
 tccttgcttt gctcttttat tcaggacaat acacttgct cagggtgtgc ttgactctc 68040
 aagcattgct ttaaagaatg accagacttt gtcataatac attcttaaag gatttcagga 68100
 catgccaccc caaaatagc tgccttcata tattgattat tttagctga tagcacttca 68160
 acagcaaatg caagagagac tttttcggaa ctcaagctgc taaaaacaga tctccaaaa 68220
 gaaattcaat tgccatatat cctctcctg ggagttttat taatcagca agatacactt 68280
 ttatcacaaa acaggaaact ggaagtcaac accacctaca gaaaaactt tcataaact 68340
 gttatatctc ccattgattc ttctaaaaac ccattcatct tccccagaa tcatttactc 68400
 caccctaagt gacttacatc accctcccc atccctcgtt aacacagtat gtaagctctc 68460
 aaatctcttt taggagtatt cattattttc ctgtggcacc ccatgaacat aatattaaaa 68520
 tgaatatgcc ttctctctta ttaatctgcc tgttgctcagt ttatttcata gacacagcta 68580
 tcgaacctag gagagtacag ggaattctt tctccctta tatgcttaa tcataagatt 68640

caactgacat cagcaatgaa acaaacattc agaaaactaa attcagagac attatatctg 68700
 gcttttctga gggagaataa taagaactaa taggcattgt caggtaaggc aatacagatg 68760
 tttttaatta aatgatgttt ttccaccatg acccacatct tgaaaacacc ttcctaatta 68820
 aagaccagta gtcttgagt attctttgaa gaacattttt acttccattt ggtcttttct 68880
 ttattgagtt gatgaatctg ctggaattag attcagcgca cataacataa aatccaaata 68940
 atgctggcct aagttcataa ggatttattt ttatcttatg taaagaagtc cggacgtagg 69000
 taatccaggc ctctgtctgc attttcttac cattgggaac ccaggctcct ctgtatttct 69060
 actgtattaa aggactgtca cctcaagtt cagctcatgg tacagatggc ggttggttca 69120
 agatgactgc tagaacatct gtcacatgc ccaaattcta gccagcagga aggaagaagg 69180
 gaggaaggac agaggggctc atatcagctc ttgtcctcc tcttaattgg cattgccaga 69240
 attcccaccc attagttttt ccttgcatct caatggtaac gtctaagtga aaaaagcct 69300
 gggaaatatt ttcatttatt attatttttt taaccaggc ccattggcca gaataaaaacc 69360
 agcttccctt tcttaaggaa gaaggagaaa tagaattaag gaacagtctc tggcatagct 69420
 tgttctccat acttttactt ccatccagaa ctgagaagtt tagacaacaa atctcttttt 69480
 gtccaccat tgccctgctt gagaatgctt cttccagagt gctacgctct cttctaata 69540

cttattatct tggcagactg cacttttcac accctccata ggctgcagt atccattgga 69600
 tgattgtccc attatgtaga taagttccta ttgctggctg ttatgcttt tctccattt 69660
 ttaggctatt agcaatcctg caataaacat tctcataatt aaatttgtat gagaattctg 69720
 tattatttat ttagaaaaag tttatagaag tggacttact gcatcaaaga aaggcacttt 69780

137

138

tgtggccttt gaattggcta atgtcttttt tggttaccca agttaaaaga tgatggaaaa 69840
 tgtcggggga caaatgctct agaaccgct agcatagacc tacactaagt cttattcaaa 69900
 aaggtccctg taaacaaaac cctagttgac ttgcagtagc tacagaatca taactggttt 69960
 tttgagagca gagattctct ccgttcctcc cttagtata cttagccagc tactggtaat 70020
 ttgcttatta tcaaaaggag cggccaggcg cggtaggctca tgctgtaat cccaccactt 70080
 tgggaggcca aggcggggcg atcacgaggt caggagatcg agaccatcct ggctaacacg 70140
 gtgaaacccc gtcttacta aaaatacaaa aaatcagcca ggcgtggtagg cgggcgcgat 70200
 ggcaggcgcc ttagtccca gctactccag aggctgaggc gggagaatgg cgtgaacccg 70260
 ggaagcggag ctgcagtaga gccgagatcg cgccactgcc ctccagcctg ggtgacagag 70320
 caagactccg tctcaaaata aataaataaa taaataaata aataaataaa gcattttttt 70380

tttcacttta gccagcgcct cagagaagaa cccacacttg attgtcttat ttttccccct 70440
 acaatgccca gagcagtatt cacacattca tgaagaaaa acacatcact tagaacattc 70500
 gaatagagca cgtgttttta ttttgcctct ctatgtttta cctccacttc tccacaattt 70560
 tgatcccttc aaaaaaaaaa cttaactaat tattctctat atattctatt aggaatcttg 70620
 gctgtagact taatcttgag gttagaaga aaatagatct tgaagccact attttggcac 70680
 attctgtaat tcttagaatt tccattctaa caattttctg gatgaattta ataaccgttt 70740
 atattttatg agctaaagt ccaattaaaa ttattcattt accatcttta agacttactt 70800
 gtctgtttta ttcaaatgca ataaaaatgc ggaactaata agagtaactc ccgatgagtg 70860
 ttcaacaaag aaaagaaaga aaacatattt tttggcgac attcaaatca ttctcttttt 70920
 ctggttaggc caaatctct catattggga aaggaaatta gctttgcttc aaagcacttt 70980
 ctgaagagca atttactaat gagcttagga attctctgcc ctcataaccc tccatacat 71040
 tacctgaacg cagagaaact tgagacgttc agcaaggag gtaaggccag gagtgttgag 71100
 gcgtccaggt ccgtctgttg agttcactgc caccttctg tgtggatttc agtccttggt 71160
 ttcttgatt ttgagttgca ttctcaatac attattttta tttttattca tagtgaataa 71220
 attgaagact gaattttttc tgaattcata caatttatat gacatgttat tttttatttt 71280

ctaaatattt tactgttgaa gtatgtcttc tttcacccaa aaaaactaat agtttttgct 71340
 gtcttttttt aatttctacg tgaccatttc tttaattatt tgtaattcac atttaatttt 71400
 attgccttg agtcaaggaa tatttctgaa aggacttctg ctcttttgaa cttattaaga 71460
 gtgtctttga ggtttaatat gtaattatta tcttaaaaat atttaatgta tactaaaatg 71520
 taagacacaa tttattgctg tgaattaaa caaagacat ccaaatgaga acaagcaatg 71580
 gctatttact cagagtttgg gattcagccc acagtttctt gtgttgacag agactcaaaa 71640
 ggctgagtg aaaagctttg caagggggaa aaaaaggcag ggtctcagct atgccctgat 71700
 tggaggctgc tggcctaggg aagttgacct gaagcacagc atcttatcgg attgcttaag 71760
 ggtgcatatt tacctttctc ctattggtcc taagttgaa gcaagggaaa caattaaagg 71820
 agctatcagt tatgaacaa gttctgggtt tgttgggcta attgctatgg tggattgtt 71880
 tggcttctg agctggttgc tgcagggtgt ggataagagt tctattttat gtatatgttc 71940
 tggccattgt ctatatgttc agtctctcaa tgcattattt gtacttattc ttttgaattt 72000
 gcctttacta attatggtct ctatatgttc tctttttata tacatatttt ttgcctgttt 72060
 aacgtatgat agatgactaa aagtgtatt aaaaacttcc acacttttgg ttggacgtgg 72120

tggctcatgc ttgtaatccc agcactttgg gaggtgagg cgggcagatc actggaggtc 72180
 aggagttcaa gatcagcctg gtcaatatgg tgaaccccc tctctattaa aaatataaaa 72240
 atcagttggg catgatggtg cagccccgta ataccagcta ctcaggaggc tgaggtagga 72300
 ggatcgcttg aatccaggag gtggagggtg cagttagcag ggatcacgcc actgcactcc 72360
 tgcactccag cctgggcagc agaatgagac tccatatcaa aaaaaaaaaa aaaaaagaga 72420
 gaaaagaaaa gcctttcaca cttctctca tcttttagta tttttgatca atgtttgttt 72480
 tatacatttc aatggtttat tatttggttc cttaaaggctc ctgattagca tatctttaat 72540
 gtatgtttgt gtatgtatgt tgatctctct ctctctctca tacacacaca 72600

139.

140

taagtctttt catttattag ctttgcttta aactttgcta atgtgatatt aatattatgt 72660
 ttatctatct tctttttatt gcacttgitt gccaaagcacc gaactaagca ttttaaataa 72720
 tatcacattt ttgtaactgt tttggcattt atcttcttca ttgtgacttt acttgaaata 72780
 attatcaatg tgtattttcta tatttgagtg tttcaatact tatcaagagt tttcttcccc 72840
 attcttgggt cctgtgtttc gacacagctc tcaactttct gtagtacttt gggtagtatt 72900
 ttttttttca agaagtcatt ggataagatt ataaacacct ggcatcttct tatgagcctt 72960
 tttcttcact ccacaacaat aatgatttag atgggtatag aaatcttgaa ttcataactc 73020

aaatctccat agatgttgct ccatttaatt ctggtatatt gtgttaccaa aaaaaaatct 73080
 aaagtcagtc caagatttct ttcttgatag gttatccaat ttgtctttt gttcttgatt 73140
 ttttttttt tagatttcat gctttcacca ggttatgtct attttttggc cgtctgttat 73200
 gtgagttctc tgagctgcca tatgtctttt tgatctgctg attaatgtga attcgtaggt 73260
 tattttcttt atgtctttga atacagatta cttaccattt attttaatct tatcttcagg 73320
 aactctaact gtctgtctat atgttagtaa ttttggcctt tctgtcatca tttaaatc 73380
 ttggtcctat tctctacgt gggaagaata atttatactt tattaatcaa taatttgatt 73440
 ttgattcaat gattagcagt gctaattcta ctttttattg tttctgaagt atcttaaagg 73500
 ttgctttgtc tatgaaaagt tttaaaacat tcttctttg tattatctgg tgccttttta 73560
 tttctgtcag cttcttgggt tttcccttct cacaacctat ctaatgtctt attatctcgt 73620
 ctttcacctt taattccata ctgtcaaagt gtcccaaaa tgtaaaaaga atgcaaaata 73680
 tgcgtaaaaa tttcagggtt tcttgagcta aagttttttt gaatatatat tctttttctg 73740
 atatttttgt gctcttttta actcaatgct aggaaatctc tctctgtctc atatgtttca 73800
 cccatctact gaaagttttt taattggcta acatctgaat aaatgcacat atcttttatt 73860

tggattatic ctacactagc tgcacaatgc catcattgtt tctccacca agaagagctg 73920
 ggtgggccaat gttcattgag aaaatcagtt tctctcaaac aggagaaaaa atggcattgt 73980
 cctatcgcta tgtgaataat tcaactaaaa agaataactg ttctcccagt aaagcttttt 74040
 ctttcttaga aaaattgggt ttctttatat tccatgcctt tgcttcagag cacaatatgt 74100
 gacctgggaa aggcatctac ccttggttaa ccttcatttt ctcatctta aaattacaag 74160
 ggttatctec atgacttta ggaagccaga actgatctgg ttctaattgt cctttgatc 74220
 taattagaaa tttccaactg caaaagtga gggggattct tacatcttca gaagccaact 74280
 aattaacaaa cttttgctgt aatgagtgtc agtcacctt atgaatcagc ttgtcactta 74340
 ataatagaaa tagctggctt ctggcccatg cagaaggaat gtagaaaata gactatagta 74400
 acaagctgac tccattctc ctgttgctc ctgctcact cagtttccac agtcaactta 74460
 ggacaattcc atactgtgat tattactcc tgccttgctt tcgtaattca acaaacagta 74520
 ttaaccactt actatggcga ggcatggctc cagggtgctaa ggaccacag tggatttgat 74580
 tacaaattac aggtaaaata ataaagcaat aaaaaggata attttgcttt catcatcgaa 74640
 agctcagtga tagagtaagc tttagacttt atttgcctca gcaatgcagc agtggtagag 74700
 ggcagaggag aagtcctc ctaagccttg ctcccaagc tgggttatagg atgctgtatt 74760

agtttgetgg gactgccgta acaaatacca aagattgggc agcttaaaca acagaaattt 74820
 actttctcac agttctagaa gctagaagtc ctctatcaaa gtgttggtta attttatttt 74880
 gaggccttct tcatggatt gtagatggct gtcttctccg tttttttcac atggcttttt 74940
 ttctgtccat gtctgtatcc taatcttctc ttcttatgag gacaccacca gttatactgg 75000
 attagggccc acccagaatt acctcatctt tttttcttca ttatctcttt aaagtcccta 75060
 tctctaagca tgtcacattg tgaaggactg gaggttagga ctttaacata tgaatttagg 75120
 ggagatgcaa ttcagcccat acaaatgcc tgcagtagaa tcatgggaac tctctccac 75180
 atgcaaagag ataaaaatgtg atttctgcaa gttttattag aaatatagga aggaacctt 75240
 cccagcaggg cttgacaagc ctgtgcatgt gcctcactga cataactaag ttatagggtc 75300
 atatttgaac taatccatgg aacaagacat gcaattacac tgatgagctt aggctgaagt 75360
 caaatgtctc actctgaaa attcagactt ccccaaaaca catgggctga acaggtaga 75420

141

tggatacttc aactgaaagc cagggtactt aacaaaagca ggagaaatag atgctgggga 75480
 ggtaatccca acgtccagtg caaatgctat gagggaaaac gacagagtcc caaacatgct 75540
 ggagcttata gtttagaggaa ggaaaaatta gatttttctc agggctttgg gattggggca 75600

142

cctggcagtc agcgccatga ttccaaagca ggtcagaaga tgcctctgcc caagtattgg 75660
 aaaccttttg aatatctttg agtattaaaa acattttaac actgcctgag aaaagtagta 75720
 gttatgaagt tatacattta gctatccca ttcaactcag gggattgtac acagatcaaa 75780
 taaattgcaa ttgtgtttcc ctccctgata ttacatagg aaggtagtg gtgagcagta 75840
 aacttcagga cctttaaagt tatcattgct ttacccttg caccagcttt ttgaggtaaa 75900
 tattccatt ttctaggaga ggataatgag gctcagagag ggtaagtggc ctcccagg 75960
 tcttctagct gaattgtaac cagcttgatc ttcttttga attccaccat cttgcctgtg 76020
 agggaaaaag gaataaggag ccaggagtgg cagggtcatt cttctctca agaggcttga 76080
 gagtaactaa gtatctgttc aaacacttt tgagaatttg gcggcctcat tacgtttctc 76140
 aggagtccct gggggagggt acacttttag gatccccagg aatagagtga caaaatacag 76200
 ctaccacaac ttggtcctgt gcaactgtgc ccttgctcag caattactga ctccattctg 76260
 actgaactct gccaaaaact cttaacatta ataattatta cctgttctca attttaataa 76320
 ttaagagttt tacaacttcc agtgactctt aattcaggtt tctttggctt actgttcttg 76380
 gacaataaca gtatggtcac tgttgacag acagaagcta gacatagtct gtatagctaa 76440
 ctccctcatg tccttcaaat ctttctcaa atgtcagttt cttttggggc cttctgtgac 76500

caacctgatg aatagagccc accagcccca gaccacagcg ttctgactt ctttactct 76560
 gcttcacttt tcccttttcc acagcaattg tcacattcta ttctactata acttacttat 76620
 ttattgaatt taccactgat tgtttgcta acctactat aagacaggga tctttgtttt 76680
 attctccaag aacttagaac agtagttatt caattaatat ttgttgagc aatgaatgaa 76740
 ccaaatgaat gaatgaaaga tgaatataaa aatatttata tgcctaaca ctctactaag 76800
 cattatgaca gaatatccac caaaaaaaaa agatgagaag gagaaaccat tattctctg 76860
 tagcagggtt aacagaacat gagcagatgg caaacgtgag attatcagca cttcttgggc 76920
 tagttcctgg aaatcagctg atttctgct gcttccaaa attcttaaag ctttcagact 76980
 cctgagcaag ctctgcaaa acacctattt tgggtctgca agcacctgca gtagctctct 77040
 agtcattcag gtacttggtg acctaggaa ctcaagccat agcttccag attttcaatc 77100
 cctgatecct cttcagcttc aaattgctgt atccaaaacc cttcctactt gcaatatatt 77160
 agaaaggcca cttctgacc aaatctgaaa agttgggtag gttttagag gatgagtttt 77220
 tggattattc ccaattcttt tgatctcac cccaacctcc taagactaaa gctacagtgg 77280
 cctcccttta gggaagaaag cagaggaaag gagcagagga attattttct gtgaattaac 77340

tgtttctaga ttctaattatt agtgactaaa ctgccatttg tacttctat attcctgttt 77400
 tagcaagagc taaaagagtt tcaagaagg taaattgtat tctaagaaga gaattcagaa 77460
 agtcctttcc agaatagatg aatcttaaat gatgggcagg tttccacag agataggtgg 77520
 ggaagccatt ctaacctaga aaacaggatg cctagaagta tgcagtgttt tcagaaaaatg 77580
 gcagacacag gcttcttgg ctagagaaca aagacttcat acaggagtag gttcataaat 77640
 acaagcacia gagaccttta tagcattggg gtctagtgt tctcaattat tctgcctata 77700
 agcatcaact gcaagaatag ttaaaattct attgaagaga agaaatgttt cctgctgtgc 77760
 cagaaacct taagaaaaag caaaggaatt tcacagagct gaagatcaag cacctgagaa 77820
 acaagtttg ctcaagagat gcttccaaag gcaagttgga agcttattga tgaaaaatg 77880
 aaacactatc acaaggagta caggcagatg ggacagaact gaaattcaaa tggctaggat 77940
 ggcaagaaaa gctgaccact tctatgtacc tgcagaacgc aaattggcat ttgtcatcag 78000
 gatcagagat atcaatgatg tgagcccaaa ggtccaaaag gtgtgttagc ttcttcgct 78060
 ttgtcagatc ttcaatggaa gctttgttaa gctcaacaag cttagcatgc tgaggattgt 78120
 agaacctat attgcagag ggtacccaaa cctgaagtca ttaaatgaac taatctacaa 78180
 gcattgttat ggcaagatca ataagaagag aactgccatg atagatacca atttgattgc 78240

ttgatctggc ttcattctgcg tggaggatct gattcatgaa atttgactg ctggaaacac 78300
 ttcaaagaag caaataactt cctgtacccc ttcaaattat cctctctatg agatggaatg 78360
 aagagaaaaa ccaactcattt tatagagggtg gagatgttgg caacagggaa gaccagatta 78420
 atgggctcat tagaaggata aaataagggtg tctgccatga ttatttttgt aatcttgtca 78480
 gttaataaac agtgactgct ttcgatttga aaaaaaata catagttaaa atacacctac 78540
 acattcacac caaagattct gatttaattg gtatgaagcc aaaccaagac attagtactt 78600
 ttccagagct tcccagggtg ttttaatttg cagccagtgc tgagaaacac tgagacgatg 78660
 cacataaaat gcctagccca gagcctgctc aagaaatgtt agctgttgct ctctactgtc 78720
 actgtttggg tgggtgagac ttgtgccag gcttcctagg ggagtgttcc tcccattgcc 78780
 ccacagttcc ctgtaagtgg tggaaaagga gacctatag cagcacttct caacaccggc 78840
 tacacatttg aatcaataga ggagccttgc caaggtttgc aaaagatggc tgggtctgtc 78900
 tctaaccaat tagaattctt gaagggtgga cccaggtatc cccattatct actttcccca 78960
 ttaactattc cacaatatc ctcatatgat ctgatctcta tttcccata atgattgact 79020
 ggtatttctc ttgtccattt cagtattcac aatctgcttt gtattaaagc tgcttattta 79080

cgttatctct cccactgtga accactgcag atcagggact ggatttgttt tgttttgttt 79140
 tagtttttat acaattgctt tccccttgca ctcagcatac agcaaagctc taacacatga 79200
 tatatactta cataatatta atttaattaa ttgtcagaaa ccatagatac tcaactataa 79260
 gactttctg ccttctccac tctacttttc catttttcat gttttctttg ttgttgtgct 79320
 tttctatgcc ttcttcacac ttagccaaa gttattttat tcaaaattca aattaattta 79380
 attatggaag ctgggtaatg agcctaataa tataaacaca gtggtgcagt gagcatgcag 79440
 ttagttacaa tgttccatct atttttctgt tgtgtgaagg catccacaat ttataaagta 79500
 cctggtgatt caaaaattaa gaaccactat tctaagagta ggtggaggcc agactatgga 79560
 atcttccaac aaccaggagc aggagtggga atggaataaa ttagagcact ggatcatccc 79620
 tgaaatccct gagcagagga acaaccgaaa cagagatgta ttttaagctta taagtctaaa 79680
 taaaagttgg ggggttaaaa aggctactta attacttctg agaaaaata ttttattcat 79740
 ttctcactgg gcttctataa tcacctcagc tctgtctgca gtttctttc ttctgtaatt 79800
 atttttctct ccattttctt gccctgatac ccacgtgctc atttgggtat ccatcaaaag 79860
 actacatttc agtatattaa ttctctcact ggatgggtaca gcttgaattt ccttctgcta 79920
 gtttcattaa aatctaaatg gggggaaaag tcctctacat tatctaggag atccatgtga 79980

gctgcccagc tccattagct gttgtctgtt agagggtgat tacaagcagg tgtaattctta 80040
 aggacaccgc cttctgtga ttgttaagaa ggaacacaga ctgagcagag cggtactgt 80100
 tctgatcagg agccaccacc actggttctt acagtataca gaatttcaat tgtcagatct 80160
 gtctctggagg aacaatagaa tacaactgtg aattaaataa tttagaaacc aaggacataa 80220
 tctcactttt ctaaatgagt ttgcctcttt taggagtcag tatattcgta gttttgctag 80280
 cacagtcctg tgatgtagga ggaaaatgcc caaaaatatt ctagaaaaaa cattgagaat 80340
 tcaagttaaa atgtcagatg gagcagcctc tagaattcct cttttagtag ccatcagtaa 80400
 tctcactgaa aattagacat gtattattta taaataataa tataatatta tgcataatct 80460
 aatatattaat gatttaggtc aaacgcagaa ggtgaaattt gtaggtgtca gaaatgaagg 80520
 ccaaatcttt agtgggaagg ctgtgggagc tgaagctctg cagagcacag tggggatc 80578

<210> 16

<211> 112190

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<220>

<221> exon

145

146

<222> (31560)..(31663)

<220>

<221> exon

<222> (64868)..(64961)

<220>

<221> exon

<222> (80499)..(80700)

<220>

<221> exon

<222> (87482)..(87558)

<220>

<221> exon

<222> (97994)..(98080)

<220>

<221> exon

<222> (101581)..(101761)

<220>

<221> exon

<222> (102663)..(103161)

<400> 16

gatcacgagg tcaagagatc gagaccattc tggccaacgt ggtgaaaccc cgtgtctatt 60

aaaaatacaa aaattagctg tgcattggtg aacgcacctg cagtcctagc tactcaggag 120

actgaggcag gggagtcact tgaacctggg aggtggaggt tgcagtgagc cgagactgag 180

ccactgcact ccagcctggc gacagagcaa gactccacca aaaaaacaaa aaaaaaaaaa 240

aaaaagaggc atttctaaga gagagacctt aaccctaagg cagacactga agaggatttg 300

gggcatgaaa taggagctgc aggttggaga acatcacaag caagggcacc tgtaaccac 360

cctaccactt ttctcaagag acagtccaga gagcgagtaa ggcacagggg cctcttctg 420

catattgaaa gtgagaagaa atgcctatgc gagtgtctag gcagagagct tgaacagcc 480

acttgtgggt ctctgcacct gcagcctggg gcagggatca gaagaatgta cttattctgt 540

gcaacaagag ccatgccttt gtgacaaagc ccgtggccca agaaggccct gcatttgga 600

caaggaggca ccaatttgat ctgctgacag ctaagtgaag ggtggaatca gagatatctt 660

aatagatgtc aatgataaca gatgatacca agaaccaggc atcttagaca cacacacaca 720

tacacacaca cacacacgtg cagcagcacc cagcagcga tgtgactgga taccgcatga 780

gttttctaaa gcttaaagat gactacaagg acaaagagta aacacttaat tgactgcaat 840

taagtttttg atatccagca gaggtaggag ttttactagc aattaacttc agtttttaga 900

cacgacaaat cttattttta ttatacaact acaacaaaat atataatgaa tgctcagatt 960

ccaggaccct atacctgggg tgatgggtgg gacgagttaa agaagggagc tggacactgc 1020

tgcctctctg cttcttttat atggggaccg tatcacaat gagctcact gtgcctccag 1080

tcatgtttac tgtgcagcaa ggcttttggc cagagaacat aattgacatg cacagagctg 1140

gagctcttgc cagctcacag caaaagggcc tctaattcag agaaaaagga gttggacctc 1200

tgccagtcac gtacctgtta tgctttcata taggcatcag ttagaccctg atctcagctc 1260

gacaaaccag aaaatataaa accatcagga tcaaggcata ctttttactg ggagtgttag 1320

cctggtaatg gagaggatg ttattgctct aagcattcgc ataatateta ttgatcaaac 1380

ctctgtgaag ctgctattct tcatgccagc gtctggcggc aaggaggagc tatttcagg 1440

ctcaccatca cagccacttc aactcaggc catgccagc tcaccagcac agcttgagg 1500

tggggcagga agtccccagg gtgaccagac agaaagcagc ctcaggacgg ggccagagca 1560

tgagactagg ggtggtggca gctgggtttt atttactctg ggctgtgtga ccttgggcaa 1620

gctgccagcc cattctgttc ctctctgcat gccatacaac cgggaattcc tacattactg 1680

agtcactcct gggccaaggt ttgatgtccc tattaaaatg ctgttgagag agtaagtggc 1740
 ttcagtcact agccctggag aatgagttca ccagtttgat ttgtttacaa ctgagaactc 1800

tttcagtttg tgtgcgtgag gtgctggggg agcaggtgga agaggctttg ctggagtggg 1860
 ggaaatatcc tgcctgggag tgggattggc ggaagggggc atatttgtca atcacaatag 1920
 aatcctagac acttatgtct gggaggcata gcataggcca ttgcattcat cttccccca 1980
 gtacctgaat ctgtgaccaa tggaaactgag gatctttact taacaacctc tagtgatggg 2040
 ataatcacct ctttctaagg caagctactt ggaaactcta agatattact gagaaaagac 2100
 cctgagccca gccttgaatt agtccaaagt ctaatgcttc tcccagggtga cagcccttga 2160
 aagagtgtgt gacaggcgcg atgccccctg aatggtctct tctcccaaat aaataatacc 2220
 tgattctccc tctgcaatgt tcatgaccca aacaaagtgc agcctctgtg tggccactct 2280
 cagtttgatg ttgtacccca aaccttcaac ctcagtctta atgcctggga atgggggaat 2340
 gtgtggaaaa aggcatgaaa cacagtacac agcaaaatgt cttaacattt ctcttgattc 2400
 tctagctcct tatccctttt cctaaaaatc tctttctaaa tctttcaagg ataaagggaa 2460
 ggggtagaaa aggggaagtg aggagaggta aaggaagatg ttcattattg ggagcctata 2520
 atgttccaaa cagtgaggac atttaatctt cacaaagtaa gtataccac cctaatttta 2580
 taaggtagaa actaagacct aagatatcta agtaagtgc ccaaagtcac aaagcaatta 2640
 cctggcaaac aatggattca gataatgact atatcatagg ccaagcccaa ttactactca 2700

aataattcac atcttcctaa gaggcaagcc ctggggggcc aagagggggg tgttgagtaa 2760
 gggcagaaaag tacaaggag acaagttgcc aatcacagct tggccctgat tattgtaata 2820
 actgacacaa ttaaagttca atttcgtatc cttagaaggt ttcgctcata ttccaaggct 2880
 gatgagaaat ttccattcta agaattggga tctgttgaat gttttaaatt caggcactta 2940
 attaaatctt ttaagatgac tctttctgtg ttgccccta gtcttttatt tctatccaat 3000
 attgttctg gaccaaatag ggtcgggctg ctgtttcttg tagcccaata atgagatgca 3060
 gatgaactgg ggaggaagag agttttttt ttaagtatat aaaaacattt attcattaga 3120
 aaacaaggag actggcaaac atatatcca aagtgaagc agctcaatgc agttcagtta 3180
 ggctaattta agagaaagc cttgcatttt aaagatcgtg tatgtatttt ttttttttt 3240
 caaaaaagga gacaggcaaa tattctacaa ggggaacaga attagaattc taggtcacc 3300
 tacaagttac cctgcacagg gaggaaagga acaggcaaga tgacttctca ggatctgtgc 3360
 ctgcgagctg atgctctgag aatgggggtt attttcttg gtgtcctgtc ttctgtcctc 3420
 taggtctaaa atcttcttc acttgactca tcaactgaga agacaacttt tggtttcttt 3480
 tcggaagctc gctgctgggt gttcggatgc cgatgggtag tacgacgggg ctctgggtgtg 3540

acgaagtcat tgtctgagc tgcagaagcc agaggctggt gcctacaaac agtggatggt 3600
 ttcttggtg ttggggctct ctggctacct gcttggttaa tctcaagctc ctcaatccca 3660
 tccaaacctc tggcatgaca ggctgaagc ttttgcctaa attcatctat tatagccttg 3720
 cctcaggct tggcccatg ttgtagcttg ccataactg acaaaaaaga actgaagatg 3780
 gactcatctg acagtttate tccaaaacag tcaaaattgc caagcatctt gcaagggect 3840
 tgctctgtga ggggcagctg tgacacacag taggccaggt cctgctgcac ctgctcagtt 3900
 taggctgtgt ggaaccgctg acacagcttt tccaccagc tttgtctgct tgtctttggt 3960
 gatgatgtag gagaagaact gcttcataat ggtgtgaaaa ggcacttcct ccacccccag 4020
 ctgggggtct gacaggtggc tgatgatata tggaaggaga ctatagattg cattgccctt 4080
 gtggaagagc tcattgaaga acttcttggc cagggcagca atttgagact cagggttgat 4140
 gagcagcatg gccatctcac tcacctgcc cttaccttc accatgtcct tgaggatcag 4200
 gtggagtcat caccagcccc actgttttcc aactggctg agcagggtcc tgaagggtgag 4260
 catatagatg aggagtccag gggccacca gattgggaaa gtggatggcc agatccccag 4320
 tggcaacgat gagattagac cggacaatgg gaagtggaga cttttctagc atggtgaaca 4380
 gaagatgagg ctgggagttg cagaaagtgg tactgatcat gcagaacttg ccaagggtag 4440

149

150

gtgaagcagc tgcagagagg tctgggttgc tatagaggcc tgagttgttg tagacttta 4500
 gcaagagtgg aacaaaggca gccagtgtct gtttgccatc caacagtcc atcttcgaga 4560
 agccgcggat tagttctgcc tccgtgtcat ctgctgcccc aaccagcccc agtcctcct 4620
 ccatagtggc ctcgaaactt gtattcttct ccttgggac tttggtcttg tgctcctgtt 4680
 cttcccgagg aactcggcgc tgacagagct ctccactcac tgcctgtccc aagtggacca 4740
 gctgctgcag agccacatcc ccagccaggg acaagagggt catcaacagg aaagtgggga 4800
 gcattgtggg agactccttc gggccccct gactggttct cttctcttct agcttctcca 4860
 gggcctgttt tgcacagccc tgccatatct gggcacagat cactgtggga ctctctgcca 4920
 gttggtaaat gagggtcact gccacctctt tgaatgggat ccagagtggg tctggtggac 4980
 aaagcctttc gggaccgtct cccgcagtca ctcaaacaac ttgtgttctt gaggcaactg 5040
 gaagtggggg tgacgtttgc ccagagaagt cttctacttg tcagagatgt tggcgatggc 5100
 atggcacacc tgctgggcca gccggtagtc ctgtggaaac ttcggaagag agttttattt 5160
 tctgcaaccg gtgacgggga gaaggcctgg aaattattgc cagaccaact taaaattaca 5220
 aagttttcca gagcttatat accttccaaa ctatatgtct acgtgtaagg tatgcattca 5280

tctaaagatg taaatggtta acttctttta atctataacc aaggctctgag tcctaaatac 5340
 cttcctctgg agcctcagta aatttactta atctaaatgg gtccagggtc tggggggatt 5400
 acccttatct tgtctcctgc taaattacag aggttttggg agttccttca gacctccaat 5460
 aaacttggtt gtggaggcct aaggagtctt cttagacccc cagtgaactt tgtttaatcc 5520
 taaatgggtc ctgttaagaa ttctttgtt atttgtcat gccttaagtc ccaggaaagg 5580
 cctaggtaaa actcttgatg ggcttttgtt acattccagc ctctgtacag gggcactggc 5640
 ttttaatat taaacttaacc actcagtcag tactgaaaga gttgtcagtg acacctggcc 5700
 tgccacaatt atgagtgtcc agaattttac tagatgtttg ggggaagggg aatgagaagc 5760
 ctgaattagg aatattctcc acgagtctct cacaatctag ttggaaagac tagtaaacct 5820
 aatgacatat taaatgataa gtaaatgaca acctgtggtc cttacttcat gcctttgcac 5880
 aactgtctct ctctacctgg atgcccttct ctcacctgat ctctccagca aagcactact 5940
 cattcctcaa gacacaaagc tgaacaggca ctctgtgaag cctgcctagt ccgcttgctt 6000
 cttcccaga agattttgcc aatcatccct cttttggaca aatatcgtgc aacactgtat 6060
 ttttaattat tcccaactcc ctgaaacact agaatgtgag caatttgaag ataggaatgg 6120
 agtttcttc cttgcattct cagcacatag cattgtgtct gaaaccaa atgtcagcaat 6180

caatagtaat tgatgagtgt ttaaagaagc actacaggaa gtggcaaaaa tcagggtcct 6240
 ccagggcaac acgatgggga cttcacagag tgggtggagc ttgtattggg ccttagagga 6300
 tgactaacat ttggagatgc tgatgtgcc aaaagtagaa agatcaggag gaataaaagc 6360
 ccagaataac gagactgtct tccccagtgt tttatgggtg tcttagatc aaatatccca 6420
 tcatgtcaca actttgaaat gaggaaaata ctttcaccaa gaagttgaat gctattctga 6480
 attacaaacc caggtgagtg ctcacaaaga acagaagacc agccagggtg ggtggtgcac 6540
 gcctgtagtc ccagctatct aggaggctga ggtgggagta tcaactgagc ccaggagctc 6600
 atagtgcct atgtggatcg gatgtttgta ctaagtttg catcagtatg gttaccctta 6660
 tcccaggagc aggtgaccac tagattgcct aaggaagcat gaaccagccc aagttggaaa 6720
 cagagcaagt caaaattccc atgctgatca gcagtgggat tatgccagtg aacagccact 6780
 gcactacaat gtgagcaaca taaagagacg cccctgtcca aaaaaacaaa gaaggaaacc 6840
 tgcaatccga gcactttggg aggttgggga aggaggattg cttgaagcca ggagtccaag 6900
 accagccagg gcaacatggc gagacctgt ctctacaaaa ataaaaataa gttaaacata 6960
 aataaaaaat tctaaatgaa ttttaaaaag aaagaaaaaa taatagaagg ctttggggat 7020

cagggcagcc caaagggtt cctggagttt caaacacaaa atagacatga gagacttaat 7080
 ctggatgtca gaccagcact agaagaaaac ctggacattt tgaagccctt aaattcataa 7140
 aactttgaca gtttcatgaa catttggtga aaccttgcca tgtccaagaa ggtcacctag 7200
 gatcagaact tccaccatc tctcttctc cccctgtcct tttctgaggt ctacaccccc 7260

151

tttgtagtag gtggtcaact ggacacagga ctaggtttat caaaacttgc tctcgggaaa 7320
 taaaaataag acaagaaata caatatacac aagaacacat gttcttgtag ctcagtcctc 7380
 gaatagcctg tctctagact ctgtttgatg taagagtggg tgcttctgaa aaaagaactg 7440
 agtgactaac aatgggttga gaagggtgcc tttcttaatt ttagttttta ttatttttat 7500
 tgaagtatga agttcaatcc ggtgcacgca agtatcagct gatgaatfff cacaacaga 7560
 agataccagt gtaactagca cccaaatcaa gaaatgttac catctgcctc tatgccccct 7620
 cctaccaatt cccagtacca cctcttcccc ccaccaagag taagccctga ggcccagaca 7680
 ggcttcacct aattttatat tttatttttt ctttttatga acagctttat taaaatatc 7740
 acataacaat acagttcacc cattaaaagt ataaaactga gtggctttta atatattcac 7800
 agatatgtat aaccatcacc aaagtcaatt ttaaaatatt ttcacacac caaaaagaag 7860
 gcaaatacct ttagctata actccacac caccctctcc gtaaccctag ccaactgcca 7920

152

atctacttcc tatgtctatg aaattgccag ttctccacat ttcataaaa tggaatcatg 7980
 taatatatta tcttttgtag ctggtttatt tcacttaaca ctttcaaggt tcatttttgt 8040
 tgtagcagct atccatattt cattttttat ggctaaataa tattctatca tatggatata 8100
 gcacattttg tttatccgtt catcagttga tgattatttc agtgggtttt accttttggc 8160
 tcttaggaat aaaatgctgc tataaacatt catgtacaac tttctgtgtg gacagttttt 8220
 tctcttgggt atgtaactag aagcagaatt gctgggtcat atggtaacac tgtggttagc 8280
 attctaagca actacagttt tatattccca ccagcagtg acaaagggtt caattcctcc 8340
 tcactctcac caacatttgt tgtttgggga ttgttcatta caaatacatg aaacagtggt 8400
 taccagagtc agtcagggtg ggaggaggga atgcagagat ttaggtcaag gatacaaaag 8460
 agcaaatagc tagaatgatt taattcttta cataaataga acctacagc atgtgtgctt 8520
 ttgtttctga cttcttttgc tcagcattag attcaggaga ttcatacaaa ttgctgcgta 8580
 tagttgcaga cagtttacta tcttatttga atggtgttct actgtgtgaa catactacag 8640
 ttgctttttt cattccacta gtgggtggga tttgggtcat ttccagttta gggctactat 8700
 gaatactgct gccttgaaca gtccaggata catcattttg tgagctgctt atttttatta 8760

tttgtgtac ctgaattttg tattatgtgc aggtattact ttttttaaat gtcctaaaaa 8820
 cacccttaag ggctttttaa ctaggatcag aaacttagct cttccctac tgacaagcag 8880
 gcagaaaaaa aaaataatag taatagctag tatttactga atgtcattg agccacctct 8940
 ttagggaaaa aaatcttttc atatattgtt gcttttaate ctccaaatta ctcaaagcca 9000
 taggtattct cattatgccc atgttagacc tgcagaaact gagaccgaag gaggttaaat 9060
 aacttgtgca aaaccataca actagcaagt agggatcac agtacaata caggtctctg 9120
 aatataaagc ctgtgcattc acctccaat tacacagcct ctgattacac tcagctggga 9180
 gttcaggagg cctgctagac atggggagga gaagctgaaa tgagagcacc tgaaactgcc 9240
 agctcagtc agctcaacag ctccgattgt tctccccacc gccccctac ttcctgtcct 9300
 aattaatcaa atgctcttga acatgaaaga gaggtagatt ggatttttgt taagatgaaa 9360
 gaaaggaatc tgttcccatc tggcaccttc aaaactctcc tattcaagcc agcaggagc 9420
 atttatgcaa cctacatggc agtttaataa ttccccaga atgccaggag attaagcaat 9480
 gtcacaaccg atctggatcc accggcactt gagaataatg gaaagagcag gggcttaagg 9540
 tctaggacag gggtaacca aatttctctg taaaggccca gatattaaat attttaggct 9600
 ttgcaggctc tatgatctct gtgtcaacta cccaactctg gcattgtaac atgaaagcag 9660

ccatgagcaa acaggcatgg ctgtgtaact aaaacttctt ttatggcaca gatatttgaa 9720
 tttcatataa ttttcatgtg cctgggcata ttttctttt ttaaaaaata ttttctaacc 9780
 agtaaaatat gtaaaagtta ttcttagttt gaaagctgca caaaaatgga ggacaaagtc 9840
 tagcgacctg aattcaaatc ctctctctgc cattgttat ttctgtggct ttcgacatat 9900
 tacttacatt cactaagctt catttctctc ttgagaaaat gagcagagca ggtgccatgc 9960
 attcagggcc tccttgtgg ctggcactga gccacatgct ttatatgctt tactgaatta 10020
 aatcctacaa taaccacaaa aggtgaaat tatatgattg cttcttcag atagttacga 10080

153

154

tgattaagaa attatgtcta taattgtgcc tgagctggcc tccatagttc attgagtttg 10140
 atgcttcctg ttgtacgcaa aaattgccat gttggttcga tgagagcatg cctgcttttt 10200
 ctactacctg tgggtgtttg agtacctata tttgtattgc acttacagtg aaaattatct 10260
 aattatatta ttctatttaa ttacaattgc atcaagctcc aataaacaat ccaaatttca 10320
 ctgaactgaa agttgagtgc acactttgaa tagtcactcc ttctgttagg ttggtgcaaa 10380
 agtaattgcc attactttta gtagcaaaaa cagcaattac ttctgcacca acctaatata 10440
 tatgtgcaca gtaggcagtt tggctcaggt acacttattc aaaacattgc attaagtaag 10500

ataatacatg ttaaatacct agcacacagc ctgggatgca ggtgtcggcc agtgtttgtt 10560
 ccccaacttc ttagtgacaa agattaggct tagctacttt ttgggaaagg tgagtggcac 10620
 cagaaagatg aggccaaggc cttatcagac acactggaac acagccttc caaggaataa 10680
 atccagaata ttttgtgtat gaggttctggc tctgaagccc agcctgttct tacaactgacc 10740
 ccccgatttc tgccttgatc agccacccac taggctgggc attgcttctc ctcaactctgc 10800
 tatctagtga cccaacctcg gcccaaccct ccagctttct tctggccatg cgactgttct 10860
 gctagtctgc tccgcatac tgcctctacc ttccgatgcc tctcttgagc ttggtctcca 10920
 ctccccactc agcacaacaa acttactttg cccagtatg ggggtacaaca gctcagactc 10980
 ttctagaggt ctaatcctgg acacctcggt tgctttataa gcacaatctg gaaagaagag 11040
 tttcattgct cagagccct caggaagcag aagaggagag tgggtgaagag agcattcatc 11100
 ctctggaatg accataactg gtgtttcaat cccagctccc ctccatacta atacttggtt 11160
 gaggttactc ccaggctctat gcttcagttt ctctcatctg aaaaaggagg ttgtaaaaat 11220
 atcatctacc ccatagggtt atgggtgatga ttaaattagt tctctatag aaagtgcctg 11280
 cagcagtggt tagcatgttg taggcacttt gtatgtgtta tctgttatgt ctgtttgctc 11340
 ttactaacat ctatatttct gagtcttaga cctccccaga gagtgtgaag ttcatggtgt 11400

ttcatgggaa cagatgtaag cccacttget gaatctctct ctgagctaata aattaacaaa 11460
 tacattgcac agtagcttac caggaaagcc tatactgggc tgaacaagaa gaaacttget 11520
 gaacaattct aaagctcact tctcaatata acagcagccc ttgctcaaca tgttgcccat 11580
 atcttcagta ccgtgcagag gtcacagcca tcatattctg ccagctcttc ccttatgggt 11640
 tgagcaacca tatgtgtctt cccaaccagg acatttttca tttttagctt cttgttttga 11700
 cataatttca ggtttacaga aaatcttcaa gaggtagtaca aataccccc tgtaccctgt 11760
 acacatattc ctgaaatgtt aatatttttc atatttgctt tatcatttcc tctatcagtc 11820
 tatctataat acctacctat ctacctatcc atccatctaa aaatgtccca ggtaatcagc 11880
 aaacctgctt taaatgtcac caattatccc aagaacatcc tttttagcac aaaaaacccc 11940
 gaatcatgta ttgtattcag ttgccatgta cgttttagtg tctttaactt agaacagttc 12000
 cttggctctt cttgtatct tatgacatca acatttttaa atagcatagg ttagatattt 12060
 tgtggagttt ctctcacttt ggggtttgtg gatgttctct tctgaataga ttaaggttat 12120
 gtgcttttga gaggatatac ccaggaatga tgctatgttc ctcttagtat atagtatcag 12180
 cagacacagt atatcaattt gtcccattac tagtgatgtt attgtcagat ttctccactg 12240

taaagatact atttttcett ttgcaactga caagtatttt aagagtacat agccatcctg 12300
 atactcetta aactttcact cacagcactt accatacagt gtagattcct gtctgaatca 12360
 atgctataaa ggtttccaaa tgatgatttt ctaatttcat tatttcttct atacttatta 12420
 gcagtctctc tactttaagg aagaaatttc cttctctcc catttttaa tttacatcat 12480
 aggttcttct tttattctgt ggggtataat ttgttgccat agttatttct ttttatgcct 12540
 agattgtcga ctggggtcag caagagccct acaatttggg gcgtgttctt gttgacatgt 12600
 ttctcagcat ttttgggcat gtcctcactt gccagcaca catgatgttc caggcttctc 12660
 ttgtcctttt cccagcccca ggccaggaat cagccatctc caatgagcca agtaaaacca 12720
 tggcatattt aagagaaagg gccacaggca taatcatggc ggggtataaac tgaaactgac 12780
 ctagaaatgc tgggtcatat tcccaatcta ccactagatg tccttccaca cctcaatagt 12840
 tcttcacagg aagcagtcct ggggcatttg gaaatggtgg gatatttgga gttatcaca 12900

155

agactggggc agcaggggtt acttctggca tttagtaagc acagcccagg catgccaaat 12960
 ttccctgcaca ggaccatcta tcctaacaca gaattgcccc ataagtagca atccctgttaa 13020
 taaatagtgg cccaatccct gaactaatct atcttgtgtt ctagtctctc aaggattggc 13080
 ttagttcttt tcaccttate cgccatcagt taatttaate accactgttt ccatagttag 13140

156

aatctaatat attagactga tcaagtgtgt taatcaaata tattggatta gctggcatgc 13200
 attatagcaa ataaaatagc cagtcttcat tttagatcta gtttaaagaa agcctctact 13260
 tcttatgtgt caatttttgc agaaaacatt attctagcaa gttggcaagg agtctaggac 13320
 ttatgttaag acacaccatc tcatccccag ttcttgacgc tctctgtcta gttattggcc 13380
 ctattcattg catcagcacc aacaacagct acccagggtt tatagggcaa gcattttact 13440
 aaacatttta cataaactat ctcatttaac cttcacagta gccctataaa tcaggcattc 13500
 ttattacaat ttacaaaaga gccctggatt ccgtgtggtc agtagcaagc ccaagatagc 13560
 acagctgtca ttagcagag ccaacattca aaatcccaca gtcgggctcc agtagccatg 13620
 ctgtgtactg cccatgcatg taagaacata cccaacacaa tgaaaaataa gaaatgaaat 13680
 agaaagggca tggaaaatat caaatcataa ctgcagagga aaaaagtcaa atttaagctt 13740
 agagtactg caaagtact gcaaccatc atattttatt ttgtgttcc tagttagtgg 13800
 ctaaaactaa gggcaaaact gactaaatat aatttgttgt aatcttgagg gaaatgcaca 13860
 gcaagatggt tcttgatcaa gaaaactgat actacggagc tttatattca gtactttgat 13920
 gaaacagcac taaaatgtcc tcaataacat ctctacaaag aatcagtgat tcttagacct 13980

ctaagaggag ccagtgtgat gcctaacaat aggcattgtg gctacttgac agacagactc 14040
 agcatagcag tcatcatcac gtagtaattt ctagcatcct agtagctttc tccactggctt 14100
 tagttttgaa taaatgggat ttttgctaag atcttacatt atgcaacaga ggcaaccaca 14160
 aagaccacce ctagaaaatg aaatgatctt ggcccccttc ctcccttacc tctgtctca 14220
 cactgcattc tttgggaagc ggatgtgtaa acagagtcag gtatacaaaa atctggggag 14280
 aagtcactcc tgtgaaagca aagggaagaa gtaagattgg gctggaggac ccatcagagc 14340
 ctgacattaa cctgacagtc tctggcagct caggaaatcct ttaggatttc catgttgggt 14400
 ataaatgatt agactcttct actataactt agtcatttgt agaggttgta ccaagaatag 14460
 catgatccca gctaaaaagc tgaggcaaac cctgaggaaat ctaacagctg gaggatgtca 14520
 gcaaaccata tacctcacag ctggacagca aggtctttct tgaaggggga tctgagcagc 14580
 atatctctat gtctgcctca ttccctatg tacaagcgtg tacctgattg cagcagaatg 14640
 agatgagaaa caaatatatt tttgttacia tttaccactt ccatctcagc ctgctacccc 14700
 ttagctctcc ttgggcaaaag ggaanaagac atttgaagag cctgcctctt ggataagtga 14760
 aaatggaact ctctctcct tctcttggat ttctaacaat ccagatcat ttctgtgaat 14820
 tctttttatt aggaaaatag catcctttaa aagagaaaac aagttgtcta tgtcttatat 14880

tcagagtcag tttgagcccc atgttgtgca atgatcttgt gcaatgataa ttacatgcta 14940
 ccatgcctca agaaatttcc ccttaagtgg agtgaggagg agaaatagtg gaggetcaat 15000
 gtcttgtttt aagaaaacac ctgttattgc tgaacctgat gcttgtgctt atgagcacag 15060
 gagttttttg tggcccagca ataaccaaca actcaggtag gccagttgcc tcatttaatg 15120
 agcttcttgg tttctgaata caacagagge aaagagagta agttttacga ggacttgggt 15180
 ttctttaatt agacacaagc tttttatttg gttgggggaa ctaatggaga aaggagagaca 15240
 ctageggcat ttgtaacttg ttaagactaa ttgaaaatct taggacaaa gttttctgtg 15300
 aagagagtgc tctaattgaga ataaatgtga tgattattta cctaattgag cagtaatgac 15360
 tgagggtgtga gccacttccc caggattaat aaagagccgg ggagttgaca gtttagacca 15420
 ttaggcttag ctggtacttc atcttgccga aggacacagt gccagaatca tattaatatt 15480
 gtaaaatgag cccaaaacat agacatatat ttttgagaa ataattttta ttggctaagt 15540
 acctgacatc aggttgggccc attcagtttt atcattaaac aaagtttcac acaagttctt 15600
 caagacttgt gccatttaca gtgttctcag cattcagtgt ttaaaaaaga aaagtagaag 15660
 agggaccttt atcaatatca aaaatagttt tttgtgcaac caaagcaag caagctatta 15720

ttatatatac acactcgtt taaaaacaac actaaagaca ttgagttgag ctggaagcat 15780
 tgcatactct gagatacaca gttgatattg ttaccacag tgccttca ggaaagccag 15840
 aggtcatctg caacaccaca attaaggata aaaggacctt atattatcag aaatttcaat 15900
 gtcttcataa aaattgtgtt tatattcaat atctccctta tttagtgtga caaatgttca 15960
 tgtacgagtc atctcaagaa aaagagttac tcagcttgct acgtattcat tattctatgg 16020
 ctctgctatg caggggaaag tgcaaacagc aactgagaga aagcaggaat ctaagacatg 16080
 ggactcaact tgccctttac acagggtgaa tcctacacta gtgaccttg tgttttaagg 16140
 aagtttgcaa atatgtttaa ttggacaaca tttcttcctt tatctagcaa gcactgagta 16200
 tcttgccagg cactatgaaa aaagataaaa ctataaacat gagcaaggca cagccactgc 16260
 caatcagaag cttaaatct agcagagatc ttaaaatgca gggagctctt ttagaaatct 16320
 gcttagggat caaaatttcc aatcacactt ttccttcag catctttatt ctgtaatcat 16380
 tattttaatc ttcattgaac gagatgatta atgtggttcc atctgctgta tgaaatcacc 16440
 catgctacag tcagccaatc aagcaacagc agtaataatg tactacttca ttaaatggaa 16500
 attaccaag ctgttactat gtaatatcac agttttaggg cctggagagg tagagctgaa 16560
 ctaaaaataa taatctctgt tatcccatag tatagtggaa taggaaagaa atacaaaaaa 16620

aaataatgtg ttcattgatt ataggacta taatagtagg gtaggaagat acacagaagt 16680
 gggaataacc aagccaatct cagtactcag aaaagggtgt ataaaggagg taacctgaa 16740
 ttaaaccttg aggaaatgga tattcttcag gtagagggtgt ataaagagct tcccacacca 16800
 atggagcagc ataaagaaat ggcatggcag agtgaacagt tgggtatggc caaggaaact 16860
 ctcaactgca tcttcttcac tgcccaact gatcactcaa cgctctccat tctctcagca 16920
 aacaccctga ctaactaaac tcccatgact agcaggatat tattagactt aacaaacctg 16980
 tcaatttata tgctttccct ttagaaagac ttgacttttt tttagtgaac tgcaatagaa 17040
 ctaagctcag gagatgcaac tatgaagat gaaggaacat tataaaaatc tctgcaatga 17100
 gattctgct tagattgctt tgctggtatg tcaactgatt actccaattt aaagaaaccc 17160
 aaactggaaa ttataaaaaga taaattgtga gtgtatttta tgcaaaaaag aatcaaatca 17220
 aatcaaagtc ttggctctac attaaacaaa cgacaaagc atgtttgttt ttatcaaat 17280
 gttttagggt agatttgtat gtatgcgtta tttctttaac caatgtttta atcagttaaa 17340
 cagctgctat tattaatgtg ctggttgaaa gtgttttct taaagtacaa atttaaaata 17400
 gaatgagaaa agatcagact tgagaagaag gaaagtcaca gtaggacatt tggaatttat 17460

tctctagacc agaggctctg aaactccagc ctacaggcca aatccatcct gcagcttatt 17520
 tttataaata agtttttatt ggattacagc caggcccatc cagtacaga attgtctatg 17580
 gttgcttcca ctctacaatg gcagatttga gtagctgtta cagagactat acgcaagtgt 17640
 gcaggagagt ttagaccaca cctacaggaa aggtatgaaa tactaccctc cttcctagac 17700
 acttcccaa acaaaaaact taagtcagtg tgggaacaaa cactgttgcc ccacagagca 17760
 ctaataaagg cagataaatg actgagaaaa ccctatccct tggggacgga ggccagaaat 17820
 ggcaacacca ataccattgg aagtctccta cttctaggta aggacatgaa attctctcat 17880
 atgcaacacc catcacagat acaaggcagg agtttgattt tcatggggag gaggaattgg 17940
 aacactgaga atacccacc cctaaggccc aggcacactg gcctatatgg gtctgtggct 18000
 gaactgggac aaaagagaag ccctaaaacc accagtagca agcattgagt aacaagcagt 18060
 agcagtatta cagcaaaaaca ggcacagctg aaagcagaga gtggggcatt aaaaccctc 18120
 agcgtctcag ctactatgct aatagaaaat ccaaagaaaa atctgaagcc cataggaggc 18180
 tgaggatgac cctactaaca aaaaaactca agtctagcta gactcctaag cagattgatt 18240
 taatacccca ctctaacaac cttaagaag tgtgccatt tccatgcata aatactatgt 18300
 atctcaatat ttgatatact ctacacaaaa tgtttgccat ttaatcaaaa tgcattgagac 18360

tcaaaaagaa aatgcaaccc actgttaaca gccaaagcaa tcaacagaac caaacagaga 18420
 catgactcca atgttggagc tattagacac ggactttaaa taaaataatt acaatgaata 18480

159

160

agaaaaatac attaaaaata cttcatgaaa gaggatatat ggatggcaaa gaagcacctt 18540
 taaaagtgtt caacagttaa tacactattg atggaaatgt aaattagttc ttccactgtt 18600
 ggaagcagtc tggagagttc tcaaaaaact taactacatg ttgaattagc aatcccatg 18660
 ctgggcatac acccaaacag aagaaaactg ttctcccaaa aggacgcatg cactcatata 18720
 ttcacatag cactatgtat attcacaata ccaaagacat ggaatcaacc tgaatgcaa 18780
 tcaatggatt ggattaaaaa atggaatact atgcagtcgt agaaaagaat gaaatcatgt 18840
 ctttacagca acttggatgc atctggaggc cattatccta agtgaattaa tgcagaaaca 18900
 gaaaacaaaa tgccacatgt tctcatttat aagtgggagt taaaccttgg atacacatgg 18960
 acataaagat ggcaacagta gaggggaaaa ggaagaacta gagcaaggga tgaatatcca 19020
 gctattgggc attatgctca gtacctgtgt aatgggatca atcgtaaccc aaatctcagc 19080
 accacacaat ataccatgt aataagcctg cacatgtacc ccctgaatct aaattaaagt 19140
 tgaaatcatt tctaaaaaaa gaaaagaaaa atgaacaaat tgaaaataaa aagatgttca 19200

acatgattag tcattagaga aatgaaaaat aaagccatga tgaaatatca ctacatatct 19260
 agtagaaca ctaaaagaaa acacactgac agtcctgagt gctagaaagt gtgtgcaacc 19320
 acagtctctc tcatacattg ttggtgggag tacacagtgg tgcagcaaca ttggaaaaact 19380
 gctgggcagt tttttatgaa gttaaacata tatttactta ctctgtggcc caacaattcc 19440
 acttctgagt atttgccta gagaaatgaa aatttatatt cacacaaaaa cctgtacatg 19500
 aatgtttata tcagccttgt ttgaaataac aaaaaactga aaataacca aacatatttc 19560
 agtgagttaa taaacatatt gtaatacatt tatacaattt aaaactatc ggcaataaga 19620
 acaaacaaat gatacacaca ccttagaaga atttcaaagg cattatgatg aattattttt 19680
 ttttttttga gatggagtct cactctgttt ccaggtgg agtgcagtgg cgcaacctca 19740
 gctcactgca agctccgcct cctgggttca cgccattctc ctgcctcagc ctcccagta 19800
 gctgggatta cagcgccag ccaccagcc cggttaattt ttttgattt ttagtagaga 19860
 cgggttttca ctgtgttagc caggatgtgc tcgatctccc gacctcgtga tccaccgcc 19920
 tcggcctccc aaagtgtgtg gattacaggt gtgagccacc gtgcccggcc tatgatgaat 19980
 tttttaaage taatttttaa aggttgcata ttttgtaatt ccatttacgt aagattctta 20040
 aaatcacaaa actataatga taaagaacac attagtgttt gctaggaaat ggggtggtag 20100

ggagtgtggc tataaaggga tagcacaagg gaatttctcg acagtgttag aactgttctc 20160
 tatcccgact gtggtgttag tgacatgacc ttatatgtat gtgagattaa atttcattga 20220
 tatatgacat gcttgtaaaa attggtgatg tgcaataat tctatagttt agttaacagt 20280
 attataccaa tgtcaatttc ctggttttca tcattatact gatattgacc aggtagagcg 20340
 tacatgggaa acttctgtct tatttttga actttaatat ggggtcttaa tgatttcaa 20400
 ataaacactt taaaacattc tccctactaa ataaccatga ttaataggtt aaagtttcca 20460
 ggggaaaaaa gtggacaaca tagatgaaca gttgagtgtt ttcacagaaa gataaaaaact 20520
 ataagcaaga ttcaagtaga aatgtgtggg ggaaataaat cacaatagta attcacagat 20580
 ttaattctag gaatcgtaga ctttacacag ccagaggaag aattaggtta tctgaagata 20640
 gatccataaa aattgcccac agtgaaaac agtaagaaaa ggacaaagaa agtggatgag 20700
 gagaacaaag tatttaaaaa tgatgggaca atatcaaata gtctaaaata tatgtcattg 20760
 aagttacaga aggagaagag agaattggca aaagaaatct ctgaatgata gctggaattc 20820
 tccaaaaata atgaaagcat caaatcatag atccaaaatt cttaataaac ctgaagcaga 20880
 ataaatttta aaaagctagc tataacttat ccaaagtacc aaataaaggt aaagaagaaa 20940

ttgaaggaag acagtggaaa atatatgaac atattaaatc agagaaattc ttaaagaata 21000
 caaaattaca gctagataga actagaataa gttctagtgt tccatattac tgtagaatta 21060
 ctatagttaa caataatata tggtttcaca taactaaaag aatattgcat gatcctcaca 21120
 aaaaaatgat aaatgctaga gatgatagat atgccagtta tactctgata actatatgta 21180
 ctgagacatc accatgtagc cccatgaata tgtacactta ttttgcatt ttaaaaaata 21240
 aattaatata aagaggtaaa gacaagaatt atagctgact tcttatctga agcaattaaa 21300

161

gccagatgat aaaacatata ttcaaagcca gctgggggga caactatcac ccagaattct 21360
 acatctagca aaaatacctg tttaaaatga agatacaata aggactattc aaaatttttg 21420
 taatgggaga attccttacc agcagacctg tactttaaga aacattaaag aaagttcttc 21480
 tgacagagga atgtgaaacc agaccggaaa ttttatctac agagagatgt gaagaactct 21540
 gaaaatagta aaaataaaga ttaatatata aagccacatt tttcttaagt ttaaatgact 21600
 ctaaaatgta attgactact tgaagaaaaa ttgtagcagt gagatttata acccatgtaa 21660
 aatttaaatg tctgataaca atagcacaaa gtttatgagg aatttgaatg tctaagtctt 21720
 cacaatatgt aagaatttgt ataataattat ataaaacatc taatactcag tctttacttg 21780
 ctgcagggaa gatcaatttg gcagggtccag cactggaatt accatttaga ttagttagga 21840

162

aactgcggaa gttcaagaaa gaaatcatca gtacctagag tatgccaaat aatagtaaga 21900
 atacagagag gattcaaatt tgagatctac ttaataaggt aaaataagga ggatgcggtg 21960
 actgagtatt gagatgttct gaatgtgagg tagagggaag agtctactat gtattatggg 22020
 ttcttggtt ggggtgtccct agcagacagt ggtgctatca agtgagtctg aggagagagg 22080
 aggataggat cattaatatg aaaagttaat gagtttggat ttaactggg gtttcaggca 22140
 atttcatgt aatgttatta ttgatgtgtt tggattgaaa tctaccactg gtttcttget 22200
 tttatttgtt ccatctatat ttttcttct ttttctctc tatttcagcc tggattaatt 22260
 gagcttttta tgatttcatt ttgtctccac tattggetta ttaattatgc ctctttttct 22320
 atttctttta atgttgcct aggttcaca atgtacatcc tctctacatt cctacagtta 22380
 tttacatac gtttcttct tgaacttctg catagtttcc taattaaatg gtaattccag 22440
 tattggacct aacaaattga tctcaccac agcaactaaa gaaatctatt tataatacat 22500
 gtttgagac ataaacatc aacaactctc acagtataaa aaaatacatc ctcttttaat 22560
 tggcatgtga gaccagaag tctggattct tcttgtttct gcagacccat ttttgccact 22620
 tcttagctcc tatttaggtc tcagcaataa caaacagatg ctaatatata acaagccaag 22680

tagtttctca tctccataac tttgttcatt ctgttatatg tgcctagaat caatattctg 22740
 cattccttctc tcacctgacc aatctctact gaaaagctca gctattgccc cattcttgac 22800
 ttcttctctg tccaccgct tttgtgctcc aactggaacc ccattcatgt ttacaagaaa 22860
 cactcaaagg acaataaagc ctgttgtagc tctacttcgg cttttctgag tattaaaatt 22920
 tcctaagatc tttcacagga caaattttta aaagcaagag taatacatgg aggtgattaa 22980
 gcctttaaag tgtacccttt gtteccaagg tcttgtaaat tatcatttag gacagttta 23040
 tctgcaatgt gctcaattac ttaggttaact aaatagcttt ttactgatca gcattgaaca 23100
 tcatttgctt aatagcaact aacaaatgct gtggcagaat tccactgata gtctacttct 23160
 agaaatagge ttatttaaga ttgagctcca ggggaaaaat agattctaac agaatagatt 23220
 attgttattt acataaccac ttaggtctag agaaacaaaa taatctttcc gttttttaaa 23280
 attaaggaat cagtaagcca aaagagaata tccaagtaac tccaagtcc attccgttca 23340
 ttcattccagt ccatttgtgc catgaaaaac ttcattgacat tctatttga tcaatcaca 23400
 ctcacagctc tcaatgactg ctcacatctg accttctcag taaggacttt tcttatagct 23460
 tagaacagtc ataggatttt tctctccaa gcttttgaca ctttgattga tagatcccat 23520
 gtgcttgcca atgctttttt tgttaactgt agaaaaataa aaagcaata cagacaggcg 23580

aaagactcag agggtcacat aacattgtat ggtgaactat accatgtgaa tggtaagga 23640
 aagcttctgg agcatgggac atattagcta ggtgttgaaa gaaaaatagg aattcaatag 23700
 gctggaaaaa ggggggaggg tatttcaagc agagggaaca cctatctaga tgcacaaatg 23760
 tatgatcaat atggtgttca acattgaaat gccacatggg gacctgacaa gaggtagttg 23820
 tattagtttg ttttgtgctg ctgtgatgga atgccacaga ctgtataatt tataaacaga 23880
 aatttattag gacacagttc tggaggctgg gaagtctaag gtccaggtgc cagaaagttc 23940
 agtgtctggt taggtcattc tcttccaaga tgggtgcttg catgctgctt agatcctcac 24000
 gtggcagaag gccaaaggga gaaagaggat gagcccatc actttttata atggcattaa 24060
 tctattcatg agggctcaac ctaaatgctt cccattaggg cccactgtca cattgggaat 24120

163

164

taagtttcca acacaccaat tcttgggcac acattcaaac tgtagcagta ggcaaagcca 24180
aatagtggaa ggcttttatt ctaagctgtg ggactcagct ttattctgtt aacagtgaag 24240
atgcagaaag ggcgagatgc agtggctcat acctgtaate ctagcacttt gagaggttga 24300
agtgagtga tcaattgagc cggggagttc. aagaccagcc tgggcaacat agtgagatcc 24360
cgtctctatg aaaattttta aaaagtaaaa gtttagctagg tgtgggtgtca cgtactgttc 24420

ccaactactc aggaggctga ggcaagagga tcacttgatc ctgggaagtt gaggctgcaa 24480
taagccatga tcacaccact gcactccagc ctgagtgaac gcaataccct gtaccacttc 24540
cccacaaaaa aagatgcaca aaaggagat ttatctccct agttttctaa aggagcaaaa 24600
gcaacttctg tgggtggaat agccctataa gtagaagggg ccaaaagata aaaagggcaa 24660
ccaaagaagg gaatgagggg atgagaagaa gacagggact catatctgca cattagtcta 24720
gggaataaag aagaaaagac acaacatcaa tctaaaaaga aataaatgaa aacaataaaa 24780
ggcagtgttg aaggcagtcg agcactgact tctatagtat gggttaaagc ccagcttcac 24840
ctctaacttt ctctgaaate ttaaaatgtt ctaacctttc ttattttgtt catctataaa 24900
atggagattt tatctcagtt tgtgtgaga ttaacaagt taatgattct aactacttag 24960
aaccttgcca aggatataat aactgcttaa taacctctca caatcatgtt ctgtgttcta 25020
gagaagtcag gtttaagggtg gtaattctct tttaaacct gaagtctacc tagagttagt 25080
taggatgtca ccattggggg atgctttgag gtaggcacat gaaacctttc tgtaccattt 25140
attgtaacat cttgtgagtc tctaattatt tcaaaataaa agttttattt tgttttgtt 25200
ttcttaaagc cttttcaaac cacaatggca attcattcaa gcattgttc agcacttgct 25260
gcattgccata ccctgagctc cttctgttct aacattagta aacctcattt tccaatatc 25320

agaaagcaat taaccaaag acagtgtgac tttccatttt tactattgct ctttagcaga 25380
aacatagcaa taaaaataaa ctattggaaa tgaaattatg agtatcctag attaatcccc 25440
aaagtgcag tttcttttgt tgttcagctg ttgtatttcc taagagcctg aaccagccca 25500
agtgcatact ctatttctga gcagagttct gccagttct ctgtctgact agaattgcac 25560
agaaaccaca aatctctcat aaagcctaag ggtgtttctc aacagaggca tgattggaat 25620
tctgagctgg ataatttaat actagggtac agcccatggg tagtacagaa aagagtcaat 25680
acttgccctg tctttgtaca accaggatgt atgtctgcat gacaataatg aagactcaat 25740
ttcagccccc attcaccett ccacaacagc aggggcaggg caccctagag cataaataat 25800
ctgaacaacc ctgtgttggg ggccctgtga agatgcttaa catccctggc cccatccact 25860
aattgtctgc catcaatcac aacttgacag ttacaagtaa attgcctgtg ttctcccat 25920
atgcctgcct ttctcattgt gtaaaaacag ctctacctcc atctgctagt cactaccaat 25980
cactcttgc aagatgggtga ctctcttct tgcctgctag tccctagaca caaagagtc 26040
aaagtgcctt ggtggcagcc atagctttta gttcaatggg acctttgcta tgttccctgg 26100
cagaagtaca cttcttttgg tgaccaggac ctccaagtgt aagagcacag aggtgcagat 26160

gaagaagtgc aaagcccgtt agtgggtcaa tgggagtgat gttacttag gccatttctt 26220
cctgtacccc ttgattctaa gacctatgta tacttctgt tagggacca acaccatgaa 26280
gtgggctctg atttaacaca tatgtgcac tttaaaggat gggaccctaa actttcagag 26340
cattaccttt aagtggcact tcatatgttc cttcagtagt tcattctagg gctctaaaag 26400
tacagctact tctgtctggt gaagtatgta atacaacag taggttctag gatcaagagc 26460
tactctacac ccccttcaca attaagtggg tccctgac acatactatg ttgtgggatt 26520
tccattcttg tttgtaate taaaagcccc cagataacag ttagctgtgt tgactatgac 26580
tcagagatca ggaaaggaaa gcttatacc agaataagt catcattgga aggatggaca 26640
gctggctgat gcaggacaga ggggaaccaa ttagtcaac ttgccacaaa tcaaccagtc 26700
gaatctcctg aagacctagt aacctattga gggtctctg ttgtctctc ttgttagcaa 26760
gttgacatt caaatcagc agtagctaga ttaccagga taattgtag tccattttat 26820
tggtaatga gtagcttgc tctctgccac tgtggccact cgattcatgt gccatcatg 26880
ccagtactta atccaaagac aaagcctgga taatgtcaac tggacaagtt atcttgtcta 26940

165

166

tttgtttttt cagtgtctct tgtgtacttg atgctttcca attagtgtta aacgcatgac 27000
 acaaaaatct tcacacattg tgcccactcc catagtccca accacatgtc tctgtctcag 27060

actcttgttt ccaatctcca agtccctttc attcaggtec ctgtccacac agctagacta 27120
 ttggctactg tgcagaaacc tatacatata ttcacacctt aggccaattt ttcttccaca 27180
 cgaatagata accatattca ttgcttgacg cttcattcat tgggaagacc ttccttctcc 27240
 actgtcttcc aaggctaccc cataattcag ctgtacttca gtgatcatct atttttgctt 27300
 tacagctact taaggaacta acccattgtc agccaggatt ggccttttac ctccctttca 27360
 gctagtcata gagaaccccc atatagccat aagtgtgagc tatgcaaggg cactggtaca 27420
 accctggttg gtgacatgga ggcactgtg ctacttgctc atgcagcctc ttcattgccag 27480
 tctagtccca tatgggtttg atcccagatg tgccatttcc attttccaat agaaggctgt 27540
 gggacacgtc tgagtgtatg acttagtgca ttggcaataa tctagctcat aatggtcagt 27600
 tccaaataca tttggtgccc cattatcagc tgttccatct tgaccaaggg tcagcaacat 27660
 tctaggaagg gtttctcaaa aggtgtataa cttgtactg aaaatggatg gcattgcttc 27720
 agagccctag gggcctgcac tctgattctt tgccttgggc atccatcaac tccaaactgt 27780
 atctttcccc actaacacat tcagcaccat ggggtccacc agatcatatg cctcaagtag 27840
 tagggttgct tatactgcag cccatacatg ctgcagagcc ctttcttgct ttcttgctcc 27900

aggcccactc aaagctgtga gacttctatg tagttcagta tatgggacca aaaatattcc 27960
 tagatgtgga atgtgttgcc tccaaaacac aaagaggcct accaggatc ttgtcttatt 28020
 tattgagatt gagaatgtaa gatacagcaa ttttaacttt acttgaaaa gcagtgggtg 28080
 gagtgggtatt ctacgagact ttcactactg aaccactaaa aactttaccg atgtggcatg 28140
 ttctgaatt ttcacagggt ttgtctctca cctccagag tgtatgtgc ctaccaatgc 28200
 ctctaagtga ttagacactt ctgttgact cttaatgaca tctttgatgt aaatggatca 28260
 atgtgatatt ctacagaatg ttcagatggt ccatgtctct tcagacctta ttatgacaga 28320
 tgtttgaaga ggtaacatag ccatgggcaa agcagaaaaa gaatattatt gtctgtttca 28380
 tgtgaataca gactctgatt ttttgatgt gtctttgtct ggttttggtc tcaggataat 28440
 attggcctcg tagaatgagt ttggaagtat tccctcctcc tctatttttc agaatagttt 28500
 gagtaagatg atattagttc ttcattaaat gtttggtata attcagcaga gaagccatca 28560
 gttctgaac ttttctttat tggaagacat tttattataa gttcttggtt tttgttattg 28620
 gtcatagttc aatcttggtc cattgtatgc atctaggaat ttgttccctt cttctgtaat 28680
 ttccaattta tttacaattt atttatttga gtcttctctc ttctttatta gtctggctaa 28740
 aggtttgtca attttgcag acatttcaaa aatccaactt tttgtttcat tgatattttg 28800

tattgttttc ttcactctca tttcatttat ttctgtctg atatttatta tttattttct 28860
 gctactaatt ttgagtttgt tatgtcttc cttttctagt tctttaagat gcatcattaa 28920
 gttgtttatt taaagtttat cttcttttcc aatgaaggta ctaatagcca taaacttccc 28980
 tcttagtgat tttgtgtat cccatagatt ttggtatggt gtgtttctat tatcatttgt 29040
 ttcaagaaac ttttaaattt tcttcttaat ttcttcattg acccaccagt cattcaggag 29100
 catatgggtt gatttccatg tatttgtata gtttccaaaa ttcctcttgt tattgatttc 29160
 tagttttatt ccattatggt cagagatgat gcttcatatt atattatttt attttgtttt 29220
 aatgttttca ggcttttttag tgatttaaca tatagtctac tcttgagaat gaccatgtg 29280
 ctgtggaaaa taatgtgtat tctacagctg ttgtttggte tatagcgcag attaaacttc 29340
 gtgtttcttt accaattttc tgtctggaag atctgtccaa tgggtgaaatt gtggtgttga 29400
 agtctccagc tattattgta tgggtctat atctctcttt agctctaaca atatttaatt 29460
 tatatgtctg ggtgttccag tgttgggtgc atatatattt acaattgtta tattctcttg 29520
 ctgaattgac ccttttttca ctatatagta accttcttta tctcttccca tagtttttgt 29580
 cttgaaatct attttgctg atataagcat aactagccct gctcttttgt ggtttccatt 29640

gacatggaat atcttttccc atccctttat ttccgccta catatgcctt atgtctttat 29700

167

168

tggtagagt tgtttcttgt aagcaacaga tcattgaatc ccttttgttt tttcaatccg 29760
 ttcagccact tggtagactt tgattggcaa gtctcagagt ctcatccaaa gtcttcaatg 29820
 tacctgggta ttgctgctgg ttattctgag cccagggact ctttagttag caggtagatg 29880
 atgttgccag gactatgtcc ttccttcaa ggcagtagtt tcccttctgg cctaggccat 29940
 gtctagaaat gccatccagg agctagagct tggaaaggcg gcctctcaga gctgactagt 30000
 gccctctcct gttgtgactg tgcgtgtatc caagatgtaa gacaaaatcc ttcctactcc 30060
 ttccttctcc ttcttctcct ttccttaagt ggaagaaaga gacctctttt ggagctgtga 30120
 gaattgcagc ctgggggttag gggaggggta gtgccagaac tcccttagcc acccaagctg 30180
 gtatctcagt agtccatgtg cctccccagt gtactggctc tgggcccagt tcagaactag 30240
 aacttgcttg aaagtgtcac tccttggtgc ctgactgac tttcaagtgt atttagagcc 30300
 cttagagcact ttagcttgca gtggttaaggc ttgtgggaac tcaagttctg accaccagga 30360
 ttggtgattt ccttttggct agagctaata taaatgctgt ctccatgggg tggggcatca 30420
 gctgagtttg gccagtttt cttttatgct ataataggac agcactaagt tcaatgcctc 30480
 acaattgctg tgcctttctc cctgggcacc taggaatgct ctccacaccc tgctgccatt 30540

ggtgggggat gggagagggg tggcgtcaga gatttaaaac tgtttttttt tttttctac 30600
 ttcttcagt cctctttcag caatatgaag ttaaaaccaa gcactatgag agctcacctg 30660
 atttttggtg cttacaaagc tacttttttt gtgtgtagat agttgctaaa ttagtgcctt 30720
 tgctgagggg ggaagagggg acgatcagtg gaaccttcta ttctgcaacc ttgctgcag 30780
 cactcttttg agaaagattc tggattacgt gataaattag tgatgtctgt catggagggg 30840
 tgaggggcag ttttagaca tatagcctat ctgcccattt ctgctataaa catctgcaca 30900
 gcttgtaaaa tctgtaacta tagaattgag tacagatgac ctgcccacaa gaggaaaaat 30960
 gtctctgact tggccttagt gcctctgtaa ttcaaccaag tatattaatt aaatggatag 31020
 atcatacact tgctgtttcc caagtgtaga ggttgaaagt ggaaaggaga agaaagcaa 31080
 gaaaactggg aggaggggca ctaagactgg gcataaggag aaacaaggag tccaatttgc 31140
 aaaataatgg gtgtagtaag gggaaatttg aagtattctc caaagataac gattttgctt 31200
 ttctcaattt tgcctcttg attctcacac agtgctttct ttagtacaga cctacatacc 31260
 ccgaaaactt ctgttctgtg acttaaaaag tcaactctat gattagcatg attcctcttc 31320
 agtcattact gaaattcttc ctagggtggtt acatttaagt ggtaagaagc ttcagtaata 31380

taagtcaaaag aactcctacc ttgctttgca ttctctcagt ggccatctga taaagcagga 31440
 aggaaaaaaa ttaaaaatga acctcccag gatttcattt ctattgtggc ttagctgcaa 31500
 atttgaaaaa taaaaataaa aataaacctt gaatgtaagc acttgtagt tttgttaga 31560
 ttctttcaca ggactgggca acatcttgac agatattaat tggcgattca ctggagactt 31620
 caccgcacct gacctgggtt gccgagtgtt ccgctatttg caggtagtgc acaccttcca 31680
 aatgtgatga gacaaactga taccagagtt agcttttaga tttatctaag gaaaatcata 31740
 taaaaccttg cattcctatg catcaaacct cccgctttct cctgggtaga agggcaatga 31800
 aaatttgatt ttaaatgtat ttcctttgct aaaaatagta tctatataaa gaaaacacaa 31860
 acgagccaca aatgagcaat gctaaggaca taaagcattc atatttcaa tgtaataaa 31920
 aatgtctggg tcaatattaa ggattttggc atattgtgga taatctccaa aaagtttgtt 31980
 aattatattt accttctact tctcaaatga actcaacgct ggctactgct cttttttgta 32040
 aaccaagggg aatttggttg aacataacca ttaactattg aattactgcc taaattatac 32100
 tttttaaagt atctattggc atttgaattt ctctctctca aatttctat tttcctttt 32160
 gaatgatttt ataactgaga gactttttag tttttctaag atctattttt agattaaaga 32220
 tattgatgct tcaaatgtca atctgcttca ttgtaagcca tatttatgta tcatatgtat 32280

atttgattta aaatattaca tatatacata ttacatata tacatacttg ttaatatgca 32340
 ttagatgttt ataatataga tttagacact tcaactaagt ctggaaggaa tggattattt 32400
 cataactggt attagggttg atgtgctgtt tctgagtctt taagattatt ttttattaat 32460
 atatttttat tctgatgcta gtacttcagg tctaaattat tatagcttta tgtatatata 32520

169

atgcatttct agaaagcttt atcctgctag attccatttg ttagtagact ctttttaggat 32580
 ctttgtatat atattcataa gtaaaatfff aatttttttc attggtttta ttattttcag 32640
 gtcattggtaa tgaagttatt ccatattcag aaaatgaata tggaatagtt acaatcttct 32700
 tttgtgctct gaataatacc ttgaaagttt ggtatgtctg aaagagcctt ttctattatg 32760
 tacggctagt attttctcag gggaaatfff taaaaacata ttcaatttc ttctgagga 32820
 tatttgcttc cttgtaataa aatgctttca attgcttatt atattagcaa tcaattgctg 32880
 atacacaaat tatgacaaaa catggtggct taaaacaata aacatttatt atctcacagt 32940
 ttctattagt caagaattca ggaacagctt ggctaggcag atctggataa aggccttatca 33000
 aaaggttcgg tcagatgctt tgtgtactg tagtcatcag aacgcttggc tgggactgga 33060
 caagatggat cactcacata ggtggtaaat tagtactggc tttagtggaa tactcagttc 33120

170

tccacatggg cctctctata ggtacatfff agtgcctca caacatagta gctggctfff 33180
 ccaagaataa cctattcaag tgactgaggt ggaagtggca acatatttat gaactagtct 33240
 caaaggctcat acaccatcac ttctataiga ttattttggt tgtacaaatc aacttggatt 33300
 cagtattgga aaagaagAAC caaaaacta ggaagtaagg attattttcg acatgttga 33360
 ggttggaac cactatct tcatattfff ccaaagcatt tgataaccta tggttctcc 33420
 caattgttaa ctttaaaatg tcttcttgat ttagaaatat tcatgtcagt aaaatfff 33480
 ctaactgtat ctacaataaa tgttaagact atatataaa tatatcttt gacataggga 33540
 aaacgataga gaaagaaatt ctgataatc tctctctat aaaggaagca agaaaattgg 33600
 caaaaaatat cagaatcaaa ttgttaaac tctggaaatt aaccaaacac ttgcaattac 33660
 tcaggagca ttattcagg aaatggctg aatctcagt agaaaaatga gctttgcgg 33720
 gctttggctt gcattattct cagccccag tatccaactc tgtaacagcc ttaaaaagta 33780
 atagctctca ttcatagtga aaacaaattg tctggcagcc actgtagaaa gcaaacagg 33840
 gacagagccc ttcaaatc ccaagaaatt gccattatt gacatgtctg gcagttctct 33900
 ggaagactcc acttgcaagg ctgtctttat tttacttaa tcagaactca cccactgtga 33960
 aaaacgttcc tctctgggc attcgtcaaa acagttacag gcaattgatt aactttgctt 34020

atgacaaagg tattggataa tagtcaggga aaacaacaga ctaaccaaag cttagaaca 34080
 tacgtgagt aatgagatat ccatagggga ttgaaaatc tctgacatac tcccaaaat 34140
 ctagaagacc aggtatatgc ccaggactat gctcactca aggaaaaaat agagaaggca 34200
 ctgagctgta acctgtgaat gatcttgagg ctttgtgcaa gcagggaagtg agggcaaga 34260
 cagaattgta agttgcctgg ctaagtgtca aatcatgct ccaacattca cacagacttc 34320
 ctctgcaatg aatgggggaa ttaatagttt ctagaatgta agaaaatctc tgtttaggac 34380
 ctatcaccaa gatcatggag taggagatat tcatccctcc aaagcattca agtatagaca 34440
 gctattcaca aactaaaata gccagagag gactcaaggg cccattaaag aatttgacg 34500
 aacatcgtga aggaaaaaat ggagaataac cacatagaaa gaattgctgg tgtgattggc 34560
 acacctaaga ggccatgatt tggctaggaa caaagaagaa aggtggaagc tatcagtatt 34620
 agacacagaa aggaccaaca ttgtctctag tggcctgctc cacaggagac actagcatct 34680
 tttccactg agtaaccaac agtcattcct gcaagagaac ccagagggg gagatgtggc 34740
 tataccttcc tctatcccc caagaagcag ttgtgtcga gctgctttgg gaatggggc 34800
 accacctctc ccaaccatgt gtaagctcca gccctggagc catggccacc ctgggaatgc 34860

ccacactcca gactgatagt ctgactacac tgggctcacc catgttttta acatcacagc 34920
 cagcaccata gtaagctagt taacactcca agcccagtg ttaactctg cctgcatgtg 34980
 tccacactcc agacactgac ttaaccacca tagagagcta gcccaccca ggcctcagag 35040
 ccattataat tctgtcata cctgtgctct cattctgtc tcttgacta atttatacgt 35100
 atactattac caacattaca gcaggggcac ctgtgccctg ggcaacagct cagccataga 35160
 aagctacgcc ttgcccac cctgaagcca ctgaaagact gtgttctcag ctcccacact 35220
 actttgcatg tgcactcatg cctcacatac tataccatgc agcagaagg gcatctgcac 35280
 cttgagcacc aatgtcatta ccattctaatt cccagagcca taatctctcc atgtgagccc 35340

171

172

atgcatcaga cctcagtttc atggctactc catgagtgtc acccatcaga cactgggtgat 35400
 actgccacta agagaggccc tacaagccag atctagtacc aagagaaatc ttctcagctc 35460
 cagcttcctt ggtgggggga aagatcagaa gaaccttagc agccatcacc actgaagacc 35520
 ctatcaattc ttgctgtac tgccaatata cactgctttg gccactgagg atccttatga 35580
 tctttatcaa ctctgacctg agctgaaaaa gctacacaga gactacaaat ctgcaccatc 35640
 actgatgcta cccacccaa caaacctcc ctcatagggc atggtcttct catagtgaac 35700
 tagttcataa aatctggaag gtgattcttt ttggttttgt tgatgtttat ctttccctta 35760

tattgatgtg tgtgcatttg actgctttac caaacgcaca cacaatcaaca taaggcaaaa 35820
 ataaacataa aaaaacagac ataacatcat caaaagaaca cagtaatttt acagtaactg 35880
 gcccaatga aatagagata tatgcaatgc ttgacaaaa aatcaaaat aattttttta 35940
 ggaaagctta gtgaacttaa agtacagaga agcaattcaa tgaaatcagt aaaacagtac 36000
 aacaaaaaca aagaattaaa gagagagact gaaattattt tttaattaaa tagaaattct 36060
 ggagctaaaa aacattataa atgaaataat aaatgcacta gacagcatcc agcagaaatt 36120
 atcaagtaga caaagaattt gtgaagtga aaacaggtta ttgaaaata tacaactaaa 36180
 gaaaaagaaa gaaaaagaa tgagaaaaga tgaagaaagc ttaagagatt tatgaggcag 36240
 catcaaaaga gaaaatgtgc aatgcattag tccattctca tactgtctata agaattgtatt 36300
 caagactggg taatttataa gggaaagagc tttagttagc tcacagttct acagggttgg 36360
 ggaggcctca gaaacttat aatcatgggt gaagggaag caaacatgtc cttcacaagg 36420
 tggcaggaga gagaagaatg agaactgagc aaaaggggaa gcccttata aaaccatcag 36480
 atctcatgag aacttactat catgagaata ccatggggga aaccacctcc atgatttaat 36540
 tacctccac tgaattctc ccatgacatg tagggattat ggcaactaaa attcaagatg 36600

agatttgggt aggaacatag ccaactata ttatacaagt tataggagtt atagaaggag 36660
 atgagagaga caaaaaaat atagattatt taaagaaata atagcagaat agtttgcaa 36720
 tctggggaaa gatacaata tccaggtgta caagaaggtc agaagtttct aatcagattt 36780
 aatgaaaata agactacacc aagacatatt ataataaac tgtcaaaaat caaaaacaga 36840
 gaaaatcctg ataacagcaa gagagaagag gcaaatcaca tataagagag ttataacaag 36900
 gctagcagaa aatttctcag caaaaacctt gcagaacagg agagactaga agaacatatg 36960
 taaggaagga aaaacaaact gccaacaaa aatatttacc caacaaagct gtcccttagg 37020
 aatcaagtag agagaaagat ttccccagac aaacaaaagc tgaaagagtt catcaccacc 37080
 aaacctattt tccaaaaatt ctacacagaa tctcaagct aaaggaaaaa aaaaagagcg 37140
 agctaattag tgacatgaaa atatataaaa gtgattttgg gctgagacaa tggggtttct 37200
 tagatataca atcatgtcat ctgcaaacag ggacaatttg acttctctt ttctaatg 37260
 aatacccttc atttcttct cctgcctaat ggccctggcc agaacttcca acactctgtt 37320
 gaataggagt ggtgagagag ggcatccctg tcttgtgcca gttttcaaag ggaatgctc 37380
 cagtttttgc ccattcagta tgatattggc tgtgggttg tcatagatag ctcttattat 37440
 tttgagatac atcccatcaa taccgaattt attgagagtt tttagcatga agggttgtt 37500

aattttgtca aaggcctttt ctgcattat tgagataatc atgtggtttt tgtctttggt 37560
 tctgtttata tgctggatta catttattga ttgcatata ttgaaccagc cttgcatgcc 37620
 agggatgaag cccacttgat catggtggat aagctttttg atgtgtgtgt ggatcgggt 37680
 tgccagtatt ttattgagga ttttccatc aatgttcac aaggatattg gtctaaaatt 37740
 ctctttttt tttgtgtct ctgccaggt ttggtatcag gatgatgtgt gctcataaa 37800
 atgagttagg gaggattccc tcttttctt ttgattggaa tagtttcaga aggaatggta 37860
 ccagttctc agaaaaatg ctcccatca ctggccatca gagaaatgca aatcaaaacc 37920
 acaatgagat accatctcac accagttaga atggcaatca ttaaaaagtc aggaacaac 37980
 aggtgctgga gaggatgttg agaaatagga acacttttac actgttggca gaactgtaaa 38040
 ctatgatcaac cattgtggaa gtcagtgttg cgattctca gggatctaga actagaaata 38100
 ccatttgacc cagccatccc attactgggt atttaccacaa aggactataa atcatgtctc 38160

173

174

tataaagaca catgcacacg tatgtttatt gtggcactat tcacaatagc aaagacttgg 38220
 aaccaaccca aatgtccaac aatgatagac gggattaaga aaatgtggca catatacacc 38280
 acggaatact atgcagccat aaaaaaggat gagttcatgt cctttgtagg gacacggatg 38340

aaattggaaa tcatcattct cagtaacta ttgcaaggac aaaaagccaa acatcgcattg 38400
 ttatcacact tagatgggaa ctgaacaatg agaacacatg gacacaggaa ggggaacatc 38460
 acaactctggg cactgttttg ggggtggggg agggggagg gatagcatta ggagatatac 38520
 ctaatgctaa ttgatgagtt aatgggtgca gcacaccagc atggcacatg tatacatatg 38580
 taactaacct gcacatttg caccgtacc ctaaaactta aagtataata aaaaaagaaa 38640
 gaaaatata aaaagtatat atcactcact gttaaaagta agtacattta caatactcta 38700
 ataagttaat ggtggtgtgt aaatcactga tatcattagg ataaaggcta aaagacaaaa 38760
 ctattaaaaa taataatagc tacaatagag gtatacctca gagatattgt gggttcaatt 38820
 ccagaatgcc taaataaagc aaatttcaca ataaagctaa tcacaatatt tttgtttccc 38880
 agtacatata aaagttatgt ttacatttta ctgtagcctt ttaaattgtg gataatatgt 38940
 ctaaaaagta tacatgttaa tttaaaaata cttaattggt aaaaaaaaa gattaacagt 39000
 catctgagcc ttcatacaat attggccttt ttactgttgg aaggctctgc tttgatgttg 39060
 atgactgctg acttatcagg gtggtggttg ccaaagggtg tgggtgctgt ggcaatttct 39120
 taaaatcaga caacaataaa gtttgttgca tcaattgact ttcccttaca tataaaaaat 39180
 tatctgtagt atgcaatact gtttgatagc attttacca gagtagaact tctttcaaaa 39240

ttggagtcaa ttctctcaaa tcttgccact gttttatcaa atatgtttat gtactagttt 39300
 aaattatttg ttatcatttc agcaatgttc acagcattat caccaagagt agattccatt 39360
 tcaaggaatc actttctttg ctcatccata ataagcaatt cctcatccat tctagtttta 39420
 ttaagaaagt gaagcaatc agtcacatgt acacactcca ctctaatc tatttctctt 39480
 gctatttcca ccactttcgc agtaccttc tccagtgaat tcttgaaccc atcaaagtca 39540
 ttcataagag ttggaatcaa ccttctacac tcctgtaaat gttgatacat tcacctctc 39600
 ccataaatca tgaatgttct taatgacatc taagtagtga gtcttcttg aaggttttca 39660
 atttcccttg tctgatcca gcagaggaat tactatctat ggcagccatg gccttcaaaa 39720
 atgtatttct taaataataa cactggaaag tcaaaattac tcttgatct atgggatgca 39780
 aaatggatgt tgtgttagca gaaatgaaga caagttaat cttttgttc atcgtcatca 39840
 aagctcttgg gtaacaatgt gcaactgcaa tgagcagtga tatttgaaa ggaatctttt 39900
 tttctgagca gtagatatca acaggagct taaaatattc agtaaacat gctgtgaaca 39960
 gatgtgctgc ctttaggct ttgtgtttt atttatagag cacaggcaca gtagattagt 40020
 ctaattgtta agggccctag gatctttaga atgatcaatg agcattggct tcaactcaaa 40080

gtcaccacct gcattagctg ttaaaaagaa tatcatgatg tcctttgaag ctttgaagcc 40140
 aggcattgac ttctcctctc tagctataga agcgttagat ggcatcttct tctagtattt 40200
 tactgtttgt ttccactgaa aaactatcgt ttactgtagc cacttctc agttatctaa 40260
 cctcaatatt ctggataact taatgcaact tctgtattat cacttgatgc tttacctgc 40320
 atgtttatat tacagagaca acttccatcc ttaaacctca tgaacaaaac tatgtagct 40380
 tcaaactttt ctgctgcagc ttccacatct atctcagcct tcatagaggt gaagagagtt 40440
 taagaacttg ttctggatta ggctttggct taatgttgca actagtttga tcatatatcc 40500
 agaccactaa aactttctcc atatcagcag taagcttgtt tcatttctt gtaattgtg 40560
 tgttactga agtagtcatt ttactttct tcaagaaagt ttcccttaca ttcaactt 40620
 ggctaactgg cccaaaacta agcttttgggt ctatcttgggt ttctgacatg cttttctcc 40680
 ctaagctaag tcatttctag cttttgattt aaagtgaac atgtgtgact ctccctatca 40740
 ctggaacacc taaagacaat ttccagggcta tttattggct taatttcaat attactgtgt 40800
 ctgagagaat aggaacagct gaggagaggg agacagatgg aggaacaacc agttgggtga 40860
 gctgtcagta tgcacacaac atttatcagt taagtttgtc accttatatg gatgtgattt 40920
 acagcaccac aaaacaatta caatagtatc atcaaacatc acttgatcac agatagcctt 40980

aatggacgta ataataacaa taatgaaaaa gctcaaaata accaaaatat gacacagaca 41040
 tgaataaac acatagtgtt ggaaaaatga cagacttgct caacacaggg ttgccacaaa 41100
 ccttcaatth gtaaaaaaaa tgcactatct gtgaagaaca ataaagtaaa tcatgacaaa 41160
 atgaggtata tttgtagtgt gttaagggtat atactatata aaaaatttaa attgtgacat 41220
 caaaaactaa aatgggggtg gtagagtaaa agtgtagagt ttttgtgtgt aatcagagtt 41280
 aagttatcat tttaaaatcg ctctgtataa gacattcctt tgtaagtctc aaggaacca 41340
 caaagcaaaa cctgtagtag atacatgaaa gataaaaagt aaggaatcaa agcataccat 41400
 tagagaaaag catcaaccac agaagaagac aggaaaaata gaagaaagga aaaaaaacac 41460
 acaaaagcaga aagagtggaa gacagaaaaa aaatatatga tagccagaat ataattatta 41520
 aaatggcaat ttagggcaca tataactgaa agtaaaaatg gaaaaaagat attccatgca 41580
 agtggaaacc aaaaatagatg aggggttgct acatttcat cecatagaat agactttaag 41640
 tcaataacag taaaacaggg caaataaggt cattgcataa taataaacgg attatttcat 41700
 caggaagaaa taacagttat aaatatatat ggaccctaca ctggatcacc taaatatata 41760
 aagcaaatat taatagacct gaagagagaa atagactgca ataaaatcat aggtcttcaa 41820

aatcccactt ttaataaaca gattatctag acagataatc agtaaaagac gattggattt 41880
 aaactacact ttagaccaaa tggacctaat agacacatat agaacatttc acctagtggc 41940
 agcagaatat ataactttt gaagcaccca aggaacattc tccaggataa tcatagagta 42000
 agccacaaaa caagtcacaa caaaattaag attgaaatat ataaattatt tttcaaaaa 42060
 caatgacatg aaactagtaa tcaataatat aaggaatttc aaaaatgtta caaacgtgaa 42120
 aattaaacaa gagactcctc aacaatcaat aggtcaaaga agaaattaaa agcaaaaatt 42180
 taaaatatct taagataaat gaaaatgaaa acacatcata acaaagctta tgggatgcaa 42240
 caaaagcagg tctaagaggg gagtttatac caataaatac ctacatcaaa caaaagattt 42300
 aaaataaata acctaatatt acaacttaag taactagaag aagaagaaga gtcagggttt 42360
 cctttcata aaaaaggaga aataataaaa attagagaag aaagaaaaca aatggagaat 42420
 agaaaaacaa tagaaaagat caatgaagag ttagttcttt gaaaagataa aattgacaaa 42480
 cctttagcta gaataactag gaaaaagaag aaaactcaa taaaattaga aatgaaagct 42540
 gagacattac aactgatacc atagaacaa aaagcatcat acaagcgac tatgaaaaac 42600
 taaatgtcag ccaggcgtag tggctcatgc ctgtaatccc agcacttcgg gaggtgagg 42660
 caggcagatc acctgaggtc aggagttga caccagcctg accaactgc agaaaccccg 42720

tcttactaa agatacaaaa attagccagg tgtggtggcg ggcccctgta atcccaacta 42780
 ctgaggagcg ttaggcaaga gaattgcttg aaccagggag gcagaagtgt cagtgcgcaa 42840
 aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aatagataac cttagaggaa tggataagtt ctagatata 42900
 caaaaactac caagactttg agtattgaag gaatggaaaa tctgaacaca ccaatactaa 42960
 ggagatttaa tcagtaataa aatgtttcca ttccaagaaa agaccaggat cagatggctt 43020
 cactgcaaaa ttctacaaa cacttagaga agaactaata gcaatcttc tcaaagtctt 43080
 cccccaaaa agtgaaaaa gtgtttactt ccaaactcat gttacaaagt cagcattact 43140
 ctgataacaa agtcagacaa gatactatga gaaaattaca gggcaataac cctgatgaac 43200
 ataggtttta aaatcctcaa caaaatacta gcaaacatat ttcaatagca cacttgaaat 43260
 attattcacc atgattaagt gtaatttatt cctggaatgc acaaatagtt taacatacac 43320
 aaattaataa atgtgacatg ccacattaac aaaatgaaag ataaaaggca tatgatcatc 43380
 ttaatagatg cagaaaaaca tcgtgacaaa attcaatata tttttagt aaaaatgctc 43440
 aacaaattag gtacagaaga gaagtgttc aacaaataa gaccacatat gacaagtcca 43500
 ctgctaacat cacagtcaac agtggtaaac taaaagcttt tcttctaaga ttaggaacaa 43560

gataagaatg ctactattg caacttctat tcaacatagt actggaagtt ctgccaag 43620
 aagtaaggca agaaaaaag aaaagaaaa agaaaggcat tcacatcaga aaggacaaac 43680
 ttaaattht tgthtgaaga tgacctgac ctacatat ataaaatata taatttat 43740

177

ataatatgta ttatgttata aatatatggt atatgttcta tgttatatat aatatatggt 43800
 ctatgttata tataatatat gttatatggt atatgttata tataatatat gttatatggt 43860
 atatataata tatgtttatat gttatatata tgttataggt tatatgttat atatgttata 43920
 gggtatatgt tatgtttatat atatgttata tgttatgtta tatatgttat atgttatatt 43980
 atatatcata tatgtttatat gttatatatt atatcatata tgttatatgt tatattatat 44040
 atcatatatg ttatagtta tattatatat gttatatggt atatttatata tgttatatgt 44100
 tatatgttat attatatatg ttatagtta tatattatat tatatatggt atatgttata 44160
 tattatatta tatatgttat atgttatata tattatatat aatatgttat ataataaat 44220
 atatagtta tatattatat ataatatggt atatattata tatgttatat attatatatt 44280
 atatgttata tgttatatat tatattatat atgttatatg ttatatatta tattatatat 44340
 gttatatggt atatattata tgttataagt tatatataat atagataata tataaaatat 44400
 ataatatata tacacaaaac acaaaacacc accaaaaact gttaaaacta acaaatgaat 44460

178

ttactatagt tgcaggatac aaaatcaaca tgcaaggtca gtaatgttcc tataactata 44520
 caatgaacta tccaaaaaaa aatagaatct atttacaata actccaaaaa gaataaaata 44580
 cgtagaaatg aagttaatca agtaggtgat agactttata aaaaaaacta taatatattg 44640
 atgaaagaaa ttaaaactagg caaaaattgg aaaggcatcc tgttttcata aatatacaga 44700
 cttaataactt taaagtgtct ataaatcaaa gctatctaca gattcaatgc attccctatc 44760
 aaaatcccaa cagcatgttt tacagaaatt aaaaaaatc aaaaattcaa attaaatcac 44820
 aaaagtccca gaattgccag tgttaacttg agaaagaaca agctcaagg catcacactt 44880
 cctgcttaca aaaaatatatt atgaagctac agtaatcgaa acagtgttgt actggcatga 44940
 aggcagacat atagacagat gaaacagaat aaagaagcca gaaataaatc catgtatgta 45000
 tgggtccactg atcttcaaca gtgatgccaa aaataaacag tgggtgccaaa aataaacaat 45060
 ggggaaagga cagtctcttc aacaagggtg tggaaaactg gacatctaca tgagaagagt 45120
 gcaatttaac ccttaactta tacaatacag aaaaaaatca actcaaaaca gattaaagac 45180
 ttaaatgtaa gaccttaaac tataaaattc ctagataaaa acaggggaaa tgttccttga 45240
 catttctctt ggcagtgatt tttttggata agacacaaa aactcaagaa acaaaaccac 45300

aaatagacaa gtgggacaac attaaactaa ataactctgg tgcaataaag aaaacaatga 45360
 atcaaatgaa aaggtgacct atggaaaggg agtaaatatt tacaagccat acatatgata 45420
 aagggttaat atccaaaata tattagaaac atctacaact caatttaaaa aatagtacca 45480
 ggcatggtgg ctcacgcata tagtcctagt actttgggag gttgaggctg gtgaatggat 45540
 tgagcgcagg tattcaagac ccgccaggga aacatggcaa acccctatct ctacaaaaac 45600
 acacacacac acacatatat atatatgtac atatatacac acacacatat atatgtacat 45660
 atatatatat gtgtgtgtgt atatatacac gtatatatgt gtgtgtatat atgtgtatat 45720
 gtgtgtgtgt gtgtatgtgt atatatatat gtatatatat atttatatat atgtatatat 45780
 atatatgtat atatatacgt atatatatat atttatatat atatatatat attagccagg 45840
 catggtgggt gtgtgtctgt agtcccagct actcaggagg ctgaggtagt aggattgctt 45900
 gaacccgggg tgtcaaggct gcagttagcc atgacagcac cattgcactt cagcctgggc 45960
 aacagagaga gacctgtct caaaacaaac aaacaaaaac ataggctgtg tgcagtggct 46020
 catgcttata ataccagcac cttgggaagc caaagcagga ggatttgaga ccaggagttt 46080
 gagaccagct tgggaacat agcaagacc tgtctctaca aaaagtataa ataaaaataa 46140
 ataaccaggc atattggcat gagttagtag tcctagctac atgggaggct gaagttagag 46200

gattgcttga gccaggagt tcaagaccag cctgggcaac atagttagac ccccatctag 46260
 gaaaacaaaa agcacaggca acaaaagcaa aagtatacaa atgggattgc aggaactaa 46320
 aaagcttctg cacagcaaaa gaactatcaa cagagtaaag atacagtta cagaatggga 46380
 gactattggc aaactatgca tctgatgagg agttaatatc cagaatatat gagaactca 46440
 aacaactcaa tagcaaaaa caaaaaataa acccaatcca aaaaatgggc aatgacctg 46500
 aatagacatt tctcaaaaa tatatatata aaagaagaca tacaatggg caacatgtat 46560

179

180

acgaaaaatat gcttaacatc cctagtcac agggaaatac aaatccaaac cacagtaaga 46620
 taccacctca gtctagttag aatggctact acagaaagac aaatgataac aagtgttgcc 46680
 aaggatgtgg agaaaggaaa ctcttacata ttgttggtgg gaatgtaaat tagaacagtc 46740
 actataaaaa cagtatggaa gttccttgaa aaattaaaaa ttgaactgcc atatgatcca 46800
 gcaatcccac taatgggtat aaacccaaaa gtaatgaaat cagtatgtca aagagacatc 46860
 tgctgtcctg tgtttattac agcactatc ataatagcca agatatggca acaatctatg 46920
 tccatcaatg gatgaatgaa tttaaaaatc ttggtatata cataatatgc aatactatc 46980
 attcataaaa aagaaagaaa ttgtttcatc tgtgacaaca tagatgaacc tggagaacat 47040

tgtgtcaagt gaaataagct acacacagaa agaaaactac tgcattgattt cactgatatg 47100
 tggaaatctta aaaagttgat ctcatagaag ctgagagtag aatgggtggtt agcagaagct 47160
 ggtgagggtta agtgaagag ggtatgggag aacactggtc aatgagtaca atgttaaagt 47220
 taaatagagg aacgggttct agtgttctat tgcacatcag ggtgaatata aaaaacaata 47280
 gtgtattata tatttcaaaa taacttgaag aaaggatttt aaatgttctc accataaaga 47340
 aatgataaat gtttaagatg atggatattc taattacctt gatttgagca ttacacaata 47400
 tatacacata tcaaaacatc atatcgtacc acataaatat gtacgattat tctggctcaa 47460
 ttgaaaaata aataaaattt tagaaacgtt aagaaaggaa tattatgaac aatcttatct 47520
 cacagatttt ataacctagt taagatggac caattccttg aaagatacag tctattataa 47580
 ctcatacagg gagaatagg caatctaat actgttaatt gtattaaagg aattaattat 47640
 tgaataaaact tccaaaacag aaagcatcaa gccagatgg gttcactgga gtattccacc 47700
 aaacatttag gaaagaaaaac tacaccaagt ctctacagtt gcattgaaaa tatagaagca 47760
 gaggcaatat tttctaactc attgtataag gtcagcatta cactaatacc aaaagcagac 47820
 aaaaatattg caaggaaaaa aacacatcaa tatatctgat gaatatagat gcaatatttc 47880
 tcaagaaata ttagcaagtc aatccaacaa atttataaaa ataattctac acttgagata 47940

agcctgggca acatagcaag aactgtacc tacaataaat acaaaaatta gccagcatg 48000
 gtggtgcata cctgtactcc tagctacttg ggagggttag gcaggaggat tatttgagcc 48060
 cagggttag aggtacagt gagctatgat tgtgccactg cactccagcc tgggtgacag 48120
 agtgagacc tatctcttaa aaaaagaaaa aagaattata caccacaaac aagtaaggct 48180
 tatccaaaaa agtaagact ggttcaacac tggatatcag ttaatgtaac ccattatatc 48240
 aataggctaa agaagaaaag tcacaagatt ataacaacag atttttaaaa agtgtttaac 48300
 aaattacaac acctattatg atttcaaaaa aaattcagta aactaggaat agaaagtaat 48360
 ctctctcaac ttgaaaaata acatctacaa aacagccttc atctgacatc ttatttaata 48420
 gtgagaaact atgagcttct ttgctaagat taggaagaaa acaaggattt cctctcaca 48480
 ttccttttca tcattgtaca gtaagtctta gctagtgcac tgagacaaaa aaggaaataa 48540
 aagacacact aattggagga gagaaataaa atgttgagg tgacatgatt gtctatgcag 48600
 acaatctaaa ataattaacc aaaaaactc tcccagaact aataggcaat taaagcaaga 48660
 ttacagaata tgtaatatata caaaagttca ttgctttcct atataaccgc aataaacaag 48720
 tataatttga tattaataaaa caatattatc tgcattagca cacctgaaaa tgaataaatt 48780

aggtataaat ttaataaaat atgtgcaaga tctatacaag gaaaactacg aaacttgaat 48840
 gaaagtaate aaagaaaaac taaataaaga gttattccat gtatacatag gaagattcaa 48900
 tattgtcaag gtgtcagatc ttctcaactt actctatgta gattcaacac agtcccagtc 48960
 agtaacccag caagttattt tgtggatatt aacaaactga ttctaaactt tatgtgaaag 49020
 acaaaacatg cagaatggtc agcataatat tgaagggtga gaacaaattt gaaggactga 49080
 tacttcccaa aatcaatatt tactataaag ctatagtaat taagacagtg tgctattagt 49140
 gaaagaacaa acaggtcaat ggaacagaat agcaagccca gaaatagtct ggcaaaaaata 49200
 tagtcaacca atatttacaa aaaagcaaaa tacaatggag aaaaggatcat aattttaaca 49260
 aatgggtgctg aaacaagaag acatccacac gcctaataat aaatctaaac acagatctta 49320
 tatccatgac aaaaacgaac ataaaagaaa acctagatga ccttgagtat ggtgatgact 49380

181

ttttagatag aacaccaaag gcatgatcca tgaaaaaaag aactgataag ctggcattta 49440
 ttaaaattaa aattaaaatt tctgctctgc aaaaggcaaa tgagaagcaa accacagact 49500
 aaagagaata tatttgcaaa aggcatacct gataaaagat tgttattcaa aatatgcaga 49560
 agagctctta aagcacaata ggtaaatgaa caatctgatt ttaaaatggg caaaaaaaca 49620
 gacacctcac caaaaaatta cacagaaggc aaataagtaa atgaaaagat gctcatatac 49680

182

ttatgaatat ctttgttatt aggggaattgc aaattaaaac aatgatatag cactgcatat 49740
 ttattagaat aatcaaaaac taaaacatta acaacacaaa atgctattga gaatgtgaag 49800
 caacaggaaac gttcactcat tgctagtggg aatacaaaat agcacagcca cttcagcgac 49860
 agtttagtgg tttattccaa aattacattc ttaccatgca ttccagcaat tgtgctcctg 49920
 ggtatttacc caaataagtt gaaaacatat attcccacaa acacctgcat acaaacgttt 49980
 atatcatggt ttttcttatt ttccaaactt ggaagcaacc aagatgtcct ttggtaggta 50040
 aatggagaaa taagctgtgg tacatccata caatgaaata ttattcagtgc ttaaaaagaa 50100
 atgagctgtc aagcttattt aaaggttacg tgtctcatgc aaagacatgg aagaaattta 50160
 tgcataatag taagcaaaa tgacagtctg agaagctaca tactgtagat tccaacttta 50220
 tgacattctg gaaaaggcaa aactctggag aaagtgaaaa cattagtggg tgccagggct 50280
 tggggagagg gaggcagagc acagaggggg aacaaaaggc agtagaacta ctctgtacta 50340
 tactataaca gtggacacat gtctatactt ttgtcaaaat acaatgtata acaccaagag 50400
 tgaatcctaa tgtaaactat gaactttggg tgataatgat gtgtcaatgt aggttcatcc 50460
 actgtaacaa atataccact cttgcatgga agcgtgatgg tgagtgagge tctgtgtatg 50520

ggggacaggg ggtttatggg aaatctgtaa cttctgctca attatgttat taatctaaaa 50580
 ctgctctaat aataaaatct acttttaaac atgtaataga attcccaaga actgtgggac 50640
 aattacacaa agtgtagcac acacatataa cagaaatacc aaaaaagaa aagagcagaa 50700
 gaagtatttg aagaaataaa agatgaaaaa ttttctaaat taatggcaaa caccaatcca 50760
 gagatccagg aagctcagag aacaccaaag caaaataaat gtcagaaaaa atgtacctct 50820
 aggcataatca tattcaaaact gcagaaaacc aaagacaaag ataaaaatct gatagaagtt 50880
 gagggggaaa cttacagata aataaacaat aataagaatt tctctgact tatcagaaat 50940
 cagccaagta agaagatagt ataataaaat atttaaagtg ggaaaagaat acaaatcccc 51000
 ctgacctaga attctctatc aagtgaatatt attcttcaaa agtgaagaag aaataaagac 51060
 tttctcagac atacaaaaaac aggaatattc tcaaaagtaa acttttctta caaaaaatgc 51120
 taaaagaagt tcttcagata aaggggaaaa tgataaaata ataagcacia atcaatataa 51180
 aggaagagca attgagaagg aataaatgaa ggcaaatata agctactttt cttactctta 51240
 attgacctat agatagttgc tcgacacaaa aatagcaata atgcattggg aatcattatt 51300
 accacttatt aggataagt aactgaatga caatattaaa agagatgcag cccaggcacg 51360
 ggtggcccat gcctgtaatc ccagaacttt gggaggccga ggcagggtga tcacttgagg 51420

tcaggagctt gtggccagcc tgaccaacat ggtgaaaccc cgtgtctact aaaaatacaa 51480
 aaataggcca gatgtgggtg cagcacctg taatcccagc tactcgggag gctgaagcag 51540
 gagaatctct tgaacccgga aggcgaaggt tgcagtgate caagattgta cactacact 51600
 ccagcctggg tgacagagtg agactctgtc taagaaaaag gggcgggggg ttgaatgcaa 51660
 agagaaatac aatttaactg aacagctatc agttaaagt aactgaacta ttaattaaat 51720
 ggatctaatt ggcatttgta gaatacttca tccagtaata gcagaatata tcttcttatt 51780
 aaacttatat gcgatttcca tcaagagaaa cttcatatgg accataaaac acattttaac 51840
 aatgtaaaaa aatagaaatt acacaaaagta tactctcaga acacacagaa tagaactaaa 51900
 aatcagtaac agaaggatag ctgaaaattt tcaaaactgt tggagattga acaacacact 51960
 tctaagtaat aagtgaattg aagaagatat ctcaagaaat attttgaaat aaatgaaaat 52020
 gtaacatcat agtttgtagg atgcagtaaa agcagttctt tgagtgaat ttataacact 52080
 gaatggatat attagaaaat aaaaaatgt gatattaata aactaatctt aggccttagg 52140
 aaactagaga aagaaaagaa atgtaggcct aaagaaagca gaataaaga aatgataaaa 52200

attggagcat aaattattaa attgaagtag aatttaaatt ttctctgcag agtaagtatg 52260

tgaggtaatg aatatgttaa ttagctttac ttagccattc cacatgtata cataaacacg 52320
 ttatacagca taaacgtata ttattttgtt tttcaattaa aaatttaatt aaaatcagaa 52380
 aaaattaata attaaattta aaacaggaat tcaatactga aaaatcaatg aaacaaaaag 52440
 ctgtttcttt aaaaagataa taaaattgat aaatttctag ccaggctaata caagaaaaga 52500
 agaggattca acattcttaa agaaaacaat tttcaaccca gaatttcata tccagccaaa 52560
 ctaagcatca taagtgaagg agaaataaaa tattttacag acaagcaaat gctgagagac 52620
 ttttgcacc accaggcctg cctaaaaaga gctcctgaag gaagcactaa acatgcaaag 52680
 gaacaaccgg taccagccac tgcaaaaacca tgacaaaatg taaagaccat cgagagtagg 52740
 aagaaactgc atcaactaac gagcaaaaata accagctaac atcataatga caggatcaaa 52800
 tttacacata acaatattaa ccttaaatgt aaatgggcta aatgctccaa ttaaaagaca 52860
 cactactggca aattggataa agagtcagga cccatcagtg tgctgtattc aggagactca 52920
 tctcatgtgc agagatacac ataggctcaa aataaaggga tggaggaaga tctaccaaga 52980
 aaatggaaa caaaaaaaag caggggttgc aatcctagtg tctgataaaa tagacttta 53040
 accaacaag atcaaaagag tcaagaagg ccactgcata atggtaaagg gatcaattca 53100
 acaagaagag ccaactatcc taaatatata tgcacccaac acaggagcac ccagattcat 53160

aaagcaagtc cttagagacc tacagagaga cttagactcc aacacaataa taatgggaga 53220
 ctttaacacc ccactgtcaa tattagacag atcaacgaga cagaaggta acaaggatat 53280
 tcaggacttg aactcagctc agcaccaagc agacttaata gacatctaca gaactcttca 53340
 ccccaaaaac acagaatata cattcttttc agcaccgcat tgcacttatt ccaaaattga 53400
 ctacataatt ggaagtaaag cactcctcag caagtgtaaa agaacagcaa tcacaacaaa 53460
 ctgtctctca gaccacagtg ctatcaaatt agacctcagg attaagaaac tcaactcaaa 53520
 ccgcacaact acatggaaac tgaataacct gctcctgaat gactactggg tacatagtga 53580
 aatgaaggca gaaataaaga tgttctttga aaccaataag aacaaagaca ctatgtacca 53640
 gattctctgg gacacattta aagtagtgtg tagagggaaa tttatagcac taaatgcccc 53700
 caagagaaag caggagagat ctaaaattga caccctaaca tcacaattaa aagaactaga 53760
 gaagcaagag caaacaatt caaaagctag cagaaggcaa gaaataacta agatcagagc 53820
 agaactgaag gagatagaga cacaaaaacc cttcgaaaag tcaatgaatc caggagctgg 53880
 ttttctgaaa agatcaacaa aattgataga ctgctagcaa gactaataaa gaagaaaaga 53940
 gggaagaatc aaatagatgc aataaaaaat aataatgtgg atatcactac caatccccga 54000

gaaatacaaa ctaccatcag agaatactat aaacacctcc atgcaataa actagaaaat 54060
 ctagaagaaa tggataaatt cctggacaca tacacctcc caagactaaa ccaggaagaa 54120
 gttgaatctc tgaatagacc attaacaggc tccaaaattg aggcaataat taataggcta 54180
 ccaacaaaa aaagtccagg accagaccaa ttcacaactg aattctacca aaggtacaaa 54240
 gaggagtgg taccattcct tctgaaacta ttccaatcaa tagaaaaaga gggaatctc 54300
 cctaactcat tttataagc cagcatcctc ctgataccaa agcctggcag agacaaaaca 54360
 aaaaaagag aatttttagc caatatcctt gatgaacatc gatgtgaaaa tcctcaataa 54420
 agtactggca aactgaatcc tgcagcacat caaaaagctt atccaccatg atcaagtccg 54480
 ctatcatccc gggatggaag gctggttcaa catatgcaa tcaataaatg taatccagta 54540
 tataaacaga accaaagaca aaaaccacat gattatctca atagatgcag aaaaggcctt 54600
 tgacaaaatt caacaacct tcatgctaaa aacactcaat aaattaggta ttgatgggac 54660
 atatctcaaa ataataagag ctatctatga caaaccaca gccaatatca tattgaatgg 54720
 gcaaaaactg gaagcattcc ctttgaaaac tggcacaaga cagggatgcc ctctctcacc 54780
 actcctatc aacatagtg tggaagttct ggccagggca attaggcagg agaaggaaat 54840
 aaagagtatt caattaggaa aagaggaagt caaattgtcc ctgtttgcag atgacatgat 54900

tgtatatcta gcccatcat ctacgcccc aatctcetta agctgatagg caacttcagc 54960

185

186

aaagtctcag gatacaaaat caatgtacaa aaatcacaaag cattcttata caccaataac 55020
 agacaatcag agagccaaat catgaggga caccattca caattgttc aaagagaata 55080
 aaatacctag gaatccaact tacaagtac gtgaaggacc tcttcaagga gaactacaaa 55140
 ccactgtcga atgaaataaa agaggatata aagaaatgga agaacattcc atgtcatgg 55200
 gtaggaagaa tcaatatcgt gaaaatgcc atactgccc aggtatttta tagattcaat 55260
 gccatcccca tcaagctaca aatgactttc ttcacagaat tggaaaaaac tactttaaac 55320
 ttcatatgga accaaaaaag agctcacatc gcgaagtcaa tcctaagcca aaagaacaaa 55380
 gctggaggca tcacactacc tgacttcaaa ctatactaca aggtacaat aacaaaaaca 55440
 gcatgggtact ggtacaaaa cagagatata gatcaatgga acagaacaga gccctcagaa 55500
 ataacgccgc atatctacaa ctatctgac tttgacaaac ctgagaaaaa caagcaatgg 55560
 ggaaaggatt ccctatttaa taaacgggtgc tgggaaaact ggatagccat atgtagaaag 55620
 ctgaaactgg atcccttctc tacacctcat acaaaaatca attcaagatg gattaagac 55680
 taaattgtta gacctaaaac cataaaaacc ctagaagaaa acctagcat taccattcag 55740

gacataggca tgggcaagga cttcatgtct aaaacaccaa aagcaatggc aacaaaagcc 55800
 ataattgaca aatgggatct aattaaacta aagagcttct gcacagcaa ggaaactacc 55860
 atcagagtga acaggcaacc taaaaatgg gagacaattt ttgcaaccta ctcatctgac 55920
 aaagggttaa tatccagaat ctacaatgaa ctcaaaaaa tttaacagaa aaaaacaaa 55980
 aaccccatca aaaagtgggc gaaggacaag aacagacact tctcaaaaga agtcatttat 56040
 gcaggcaaaa aacacatgaa aaaatgctca ccaccactgg ccacagaga aatgcaaatc 56100
 aaaaccacaa tgagctacca tctcacacca gttagaatgg caatcattaa aaagtcagga 56160
 aacaacaggt gctggagagg atgtggagaa ataggaacac ttttacctg ttggtgggac 56220
 tgtaactag ttcaaccctt gtggaagtca gtgtggcgat tcctcaggga tctagaacta 56280
 gaaataccat ttgaccagc catccatta ctgggtattt acccaaagga ctataaatca 56340
 tgctgtata aagacacatg cacacgtatg tttattgcgg cactattcac aatagcaaag 56400
 acttgaacc aacccaaatg tccaacagt atagactgga ttaagaaaat gtggcacata 56460
 tacaccatgg aatactatgc aaccataaaa aaggatgagt tcatgtcctt ttagggaca 56520
 tggatgaaat tggaaatcat cattctcagt aaactatgc aaggacaaa aatcaaacac 56580
 cgcaggttcg cactcatagg tgggaattgg acaatgagaa cacatggaca caggaagggg 56640

aacatcacac tctggggact gttgtgggt gggaggagg gggaggata gcattaggag 56700
 atatacctaa tgctaaatga caagttatg ggtgcaccac accagcatgg cacacgtata 56760
 catatgtaac taacctgcac attgtgtaca gtaccctaa aacttaagt ataatagtaa 56820
 taaaataaaa tttaaaaaaa gatagcatga gtagaaaaa aaaaaagaag agggaagcca 56880
 caagttacta atatcagaaa tgaagagggt gtcactacta ctgattctgt ggacattaaa 56940
 agaatgataa ataaatacca taaacaactc tatgccaca agtttgatag cttagatgaa 57000
 atgaacctat tccttgaaaa gctcaatctg ccaaaaactc cataaagtga aatagataat 57060
 ttgaataggc ctatacctac taaagaaact gaattaataa ttaataatct tccacaaaag 57120
 aaaacaccag gccagatgg gttcattagt gaattctgtc aatcatttaa aaaaaaatg 57180
 gtaacaatta tctgcagtct tctctagaaa acagatgaaa agggaacat tcctaattca 57240
 tatacttgct gacttgctc atgaggccag aaatgcccta attctaaaac caatgatatt 57300
 aaaagaaagg aaaactacag aacaatatcc ctcatgaaca taaatgcaa aattctcaat 57360
 aaatattagc aacttaaat tttgtttaaa ggtataatca tgtatagaaa gaattatagt 57420
 ccgtggccaa gtgagattta ttccaggcat gaaaatctgg ttaaatattt aaaaatcaat 57480

taatataatc tatcacacaa acaagataaa gaaggaaaat tatgtgattt ttccatcaat 57540
 ggacacagga aaagcattta acaaaattca acatccattt ataataaaa ctcagcaaac 57600
 tggaaacaaa gagaaactgc ctcaacttca ttaacagcat ctaaaaaac catacagtta 57660
 acctcatatt taatggcaag aaattagggt cttttgtcct aagactggga acaaggtaaa 57720
 gatgtcctct ctgcacctc ccattcaaca ctgaactaga tgtcttagat aatttaacag 57780

187

gacaagaaaa gtaataaaaa agttttatata ttggaaaaga tgaataaaaa atgtctttgt 57840
 taataaattt gtaattttct atattaaaaat ctgaaagaat agacaagaaa aataaaaaaca 57900
 aacaaaaaag aaacttccag acctagtagg caaaaaaatg gcaacactga agaataagaag 57960
 gttaatatata aaaagtcagt tgtttttttc cagcaattac caagttgaga ttgaatttaa 58020
 aaacacaata ccattttatgt gaacacccaaa aaatgaaact taggtgtaaa tctaacaaaa 58080
 tatatacaag atctattgaa gacgactaca aaactgatgg aaaaaaaagc aaatatctaa 58140
 ataaatgaag agatgttcca tgttcatgaa taggaagact taatattgtt aagatgtcta 58200
 ttctgcccaa cgtgatctat aaattcaata caattccaat caaagtccca acgagatatt 58260
 ttatcaatat aaacaaactc taaaatcata tggaaaggca agagacacag aataaccaat 58320
 gcaatattaa agaaaaagag caagtttgaa caaccaacac tacctgattt taagacttac 58380

188

tataaagctt cataatcaag acagcatggt attggtaaaa gaatcaacaa gtagattgat 58440
 gaaacagaac agagagccca gaaatagaca tacaaaaaga tagtcaacta gtctttgaca 58500
 aatgagcaaa ggcattgaga gatagccttt tcaagaatgg ctgtcttagt tgaagagtg 58560
 gttgaatata cacatgcaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaac ttaattgtaga ccttatgcct 58620
 ttcacaaaaa ccaactcagt ttagatcata gatataacat aatgctcaat actattatat 58680
 aaaacgacta gaagataaca taggagaaga ttttaaggac ctactctttg tctatgagtt 58740
 tttagataca acaccagaag cataatccat gaaaaatgat tgaatgttg gacattatga 58800
 aaatttaca ctttgcaag gacactgttt aagagaatga aaagacagcc ctcagaatgg 58860
 gagaaaatat ctgcagaata tatatttcat aaaggatttg tatccaaata tgtacaaaaga 58920
 actcttaaaa ctcaacaata agaaaaaac tcatttcaaa aacggccaaa agatctgaat 58980
 aaacccttca ccaagaagat ggcaagttaa cagatagaaa gaagctcaaa atcatatgcc 59040
 attagggat tgcaatttaa aacaacagt agacaacact acacatctat tagataatca 59100
 ctaaaattca aaaaaaactg aaataccaa tggctgatga ggatgaatat taacaggaaac 59160
 tttcattcat tgctgctggg aattcaaaat agtacagtea ctttgaaga taatttagca 59220

gtttcttaca aaactaagca tggctttacc atacaaccca gcaattgtta ggctatgtat 59280
 ttactcagtt gaggtagcaa cttatatcca cagaagaatg tttattgtag ctttattcat 59340
 aatcaccaaa aactgggaagc aaacaagagg ttcttcaaaa gctgaatgga taagctgcgg 59400
 tacatccatt aaatgggata ttattcaatg atataacaaa atgggctatc cagccatgaa 59460
 aagacatgga ggaatcttaa atgcccattg ctaagtgaag gaagccagtc tgaaaaagct 59520
 acatactaaa tgattcaact atattacatt ctcaaaaagg caaaactgta gaagagcaag 59580
 aaaccagtgt tgccagagat ttggagtagg aaagagatga atagataaaa gcagtggatt 59640
 tttaggacag tgaactctt ctgatattat aatgtgggt acataacatt atgcaatggt 59700
 caaaacccat agaactgtcc aacacagagt gaaccttaat ataaacaatg gactttagtt 59760
 aatgataata tatccatatt ggttcacag ttttaacaaa tgaactacaa gatgttaatg 59820
 acaaggaaaa gtatatagat gggagggagt catagggaaa cctctgtgt tgttgcaat 59880
 tttttgtaaa tataaaattg ttctgaaaaa taaagtctat tttcttaaag tcagtccagg 59940
 gatectcctt tatatgaata caatctggca ttttgctaag taaaatttct ctgtttccag 60000
 catttaagtc tcaattctct gtgcaagatt ttctttagtt ttatatattc taggtcattt 60060
 ctgtcagaat taaggggtgg gtagtgaga attcagacat atgtcctcaa gctgccatct 60120

gttctccaaa tggatccca tatgtgttg atgtgtagag ttttcattgt tgacatttat 60180
 gaattgacta taattgtact ttgatttctt tcttgactcg agttaattat gaggggtgtt 60240
 aaatttccaa gtggtatttt ttaaaaaaac atgttactaa tttctgcttc attgctcatt 60300
 gttttaaata tgtgatttgc gtaagtctta ctttttagag ctattgagag ggtttttttt 60360
 cttggtagtt tagtatatcg ccaatttttg aaatgtctag atattttata gcaatgtgta 60420
 ctattcttat gttatgaagt ctattttttt ctatctgtat atttttgttt attcttctgt 60480
 aaaaacttga acggtttcat tatatattta gcattatgtt acttggtaca tataactttg 60540
 tgaatatect attgccatca tgtgtgtat cttttatcaa tataaataat cttttatcac 60600

189

atgaaatgct gtttgccttg aatttaattt gtctaatagc aatgttgtaa tgaatgcctt 60660
 ctttaatttt tactttcttg atataacctt gcccatccct ctatttccac acttagatat 60720
 ctaagtgatg tggtttaaaa tttttctctt ttaaacagca tagaattaga ttttagggaa 60780
 gttttaaaat aagttatttt cttaatgaaa gaccttaagt cattcacatg tattgcgaca 60840
 aatagtgttt tggtttggtg taatttcagt tccttatttt agtctttcta tattaagggt 60900
 tttttgttg tttgttgcta tttacttggt ttttcttttt atttgattat caattgtggt 60960

190

aggettgaaa aaagctcccc gccctaccc cccaccacca ccaccaccac aaaatccgta 61020
 tcctaatecc tggaaacctgt gatgttacct tatataagaa aagggaactt cacaatgta 61080
 atcaaattaa agatcttaaa actgggagat tattctggtt tatcccagtg attcccacat 61140
 gtaatcataa cagggttgga gaaggagtg tgacacacag acagaagagg aaaaggcaga 61200
 gcttgggccc atatggtcac acgccaagga ctgctggcag tcacccgaag ccagaagagg 61260
 caaggggcag atttcccct agagtctctg gaggactcat gggcttgcca aacttttatt 61320
 tttgccagt agaactaatt ttggacttct ggtctccaga gctgtgcgag aataaattta 61380
 tgttgtttta agccataaag tttgtagtag tttgttacag ccaccatagg aaactaatta 61440
 aaatttctcc atttttattt tactctatca tagcttatct ttaactttta gctttaatat 61500
 atctctatca aggttaaaaa acaaaagaga gacccaaaat acataacaaa attgaacatg 61560
 atgtctttct ttgtactctg tcccttcaact caactccctt aagtttttcc tgaaatgttc 61620
 catagtcata ttataatta ttttgaagc atttcatgtg ttcttaactt cattgcttac 61680
 catagtgtt attattctat gctcttccct cttcttgaat tcttaatttt aattcaattc 61740
 tcaattagct gaagtatgcc aggaagacta taaaatatta tattttcttc cttcttatat 61800
 atctgagaaa actgttctgt gccttggcac agaaatcata tttacaaagt tcttgaatca 61860

caattttttt tcaaaactct gaacatgttg ttatagtgtt ttctggcatt actttttgtg 61920
 ggaaagagg atgataattt aagatgcatt tcttttaggt aacttttaaa tttttttacc 61980
 ctgccttaaa tgctgaaga tggtaaatct ctgaaattaa atactctttt gattgtatct 62040
 caaagtcagc atctttttat caacattgac tgctcttctg gacactctta tttatggctc 62100
 ttctctctgc tccagattct gaactgtgcc tgtcacctcc ctcaagacag ccacagagcc 62160
 ccaagatcct tataacctca ccatgatgtt ccactccaca ggggtctgcc attgtgtgct 62220
 ttctttttca tcttctctg atgccacctc ctctctgtt tgttgccagc cttataaatt 62280
 ttaaattcat ggatcacagg tagaaacccc agttttgtct aagtagacga tcgatttttt 62340
 ttttcttaaa gctagtcttc catttttctc tttctctatt tgtcaccttt tcccaagaga 62400
 taatttttct ttttagtttt cagaggagcc ttcaatttct ttttttaaac cttttttcta 62460
 acttttattt taagttgagg ggtacatgtg caggtttctt atacaggtaa acttgtgtca 62520
 tgggggtttg ttgtacagat tatttaatca cccaggtatt tttttttttt tttttttttg 62580
 agacggagtc tcgctctgtc gccaggctg gagtgcagtg gcgcaatctc ggctcactgc 62640
 aagctctgcc tcccgggttc acgccattct cctgcctcag cctcccgagt agctgggact 62700

acaggcgcce gccactacgc cgggctaatt ttttgtattt ttagtagaga cggggtttca 62760
 ccgtttttagc cgggatgggc tggatctcct gacctctgta tccacccgcc tcggcctccc 62820
 aaagtgtcgg gattaagctt catattcatt agttattttt cctgatccta accctcctcc 62880
 caccctaac cctctatag gccccagtgt gttttgttcc cctctatgta tctgtgtgtt 62940
 ctcatcagtt agcttccact tataagttag aatatacagt attttgtttt ctgttcttgc 63000
 attagtttgc tgaagataat gccctccatc catgtccatc catgtccctg caaagcacat 63060
 tatctcattc tttcttacga gccttcaatt tctaactatt cctcagaacc tctccctat 63120
 ggtggctttc acaacattag tgctgagatg cattttaga aataacaaat cataaagaac 63180
 cacaatgtgc ttgattgtta tttgtctgag ccagagaaag aacaaaaagg cacgaattca 63240
 gaacaaagat aactgccaag aagaaagtga agtaaagtgt ctccattaga cttcaatcta 63300
 caagttactc ttctactccc tctggatttg aacctaatgt tacaaagtgg agatacagcc 63360
 agactcttga tagaaatgag gctccaagtt acctgaaaaa tgtccacctt gatcatcctt 63420

191

tcaaatatat ttcatttaaat cacattctaa atatgctctt cacataagag aaattaactt 63480
 cttaaatccc aatttccctt tctgctaatt atgcaaaaaa agattgtaca cagataatta 63540
 aaaggtgtgg gtaaagttaa taaaagagac agtgggaagg aagaggagac ccagatcctg 63600

192

agcctaataga agtggatgaa aaaggggagc tctctgatgg tgctcagtgt gatgatgata 63660
 aatgattcaa caccgcacat aggctcccta aaaccggaac cttctatca tctcttgact 63720
 cccactgata aaaagcaaat gaacttttgt ttctaattat tctggaatgt caattgtggc 63780
 agaaaaaatt agtttagctt taaaagtcaa ttccaaacaa atgtaccatg caaatgtcaa 63840
 ggactgatcc tgaatatgg agtttccaag aggccaagg aataagttag caagaaagaa 63900
 ctgaagcatt gtcactcatc atggccagca gtacaaatc tagcaccagg aaccaaactc 63960
 tgcttccctgg tgggagatg aaaagggaga gttccctggt ccatccatca caggacatgg 64020
 gacaggggta tggctctctg ttcagcttcc tcaagctcaa actccttata ggagggggag 64080
 catgcagaag gtaggtgca ggagccagg caagtgcatt gaactccggc cccacagtag 64140
 tgtctggggt ggtgacctgt gactcctgaa gcccagtggt tatagtgtg ttttaactct 64200
 gccatctgca gatggcttaa gtgtaacca gctcagtgc cttctggtgg ccatgtctc 64260
 gtccataggg caggaagagt caggtcacac acagactga aggatgaatg caggagtgtt 64320
 attgagtgtt ggaggtggt ctcagtggga tggatgggga actggaagg ggatggagt 64380
 ggaagatgat cttccctgg agtttggtg tccagggcca ttctcctgtc tgattgtccc 64440

cagctgaact cttcttagtg ttcagacct cttctcttc tctccttctc tgccatgctg 64500
 ttctgccatt cgtctgctca tctcctcctg gagcctggga tttgggggtt atatgggtac 64560
 aggatagggg catgtagctg gccaaaagg aactttttgg gcacaaaaac aggaatacct 64620
 gttctcattt aagaccactg gtttccaggc ttgaggggtg ggtctttgct gggaaactgc 64680
 cctctttcac ccagtatttc ctttctctt gtccatgtaa gagagtatt tcccttcccta 64740
 atccaacact cacccttct tgggttcacc tctcagatt cttaaataca caagggtgcta 64800
 ttctttccat tatgtgctt cctcaccctc tctgaagtea taagcttct ctcatttctg 64860
 tcttttaggt gtgtgctct acgcctctac ctacgtcctg gtgtccctca gcataagacag 64920
 ataccatgcc atcgtctacc ccatgaagtt cttcaagga ggtgagctgg ctttaccagg 64980
 tgctctttca taaagaactg tccttgagt agggtaggat catttccact aatattttac 65040
 tcttaataat agtgatctc ctctcttct cttctcttct tctctctctc attctctctc 65100
 tccacctctt tctcacttc atgggtctga ttgtctaaaa agatgtacaa aagaaaaact 65160
 agatgcctgg aaaaatgccg atggttccca tggacagccc agagccacta aggaaggtgg 65220
 gtggctgacc cactttgtga ccattcagct tgatgctgat gcttccatct tttcctcta 65280
 gagcagtgtt gacatgcata cctgtccaaa gaaatgaact ctccacact aacttctcat 65340

tttccagaaa caaacacctt gttctcctta tccaaaacca tagaaataat tggaaagatg 65400
 tttttaattg atcatcgtat tgggaaaaaa aaataaggaa actctctttg atccagaaat 65460
 ggttagggat ccctaagaaa aggaagcaga tgggtcagag ggaaggctga gaccacacag 65520
 cccacaaaac ccttaggaga tgetgaagt ggatgggagg ccttaggagc acttctgaa 65580
 caggctgcat caatgtggag ttagggagag gacccgagge aactgacaag gtgatttctg 65640
 aagtacaaca cagaggatta atcacagcaa gtttccctgg atttgaagag gcagagaggg 65700
 gccctgggga gcagttaatg ccttagaggaa ggttgagtac atattcacia gactagctgc 65760
 ctactgtctt gccacaatc agagaccact ctctccata caccctgaaa gcaatacaaa 65820
 agccattgtt tagcaacctt ttctccttc ctccagataa cttcgaaaac tgataaagaa 65880
 cctaacaaaa aatcttgacc acaaaaatga gtgcaatcaa atattattta aaaagtgaca 65940
 aaatccaaac tgtagaaaac agataatacc tttaaaatct cattccacac aatttgatc 66000
 tagggaagca aatttaatag aagtagcaga attttaggat aaatataatt aacgtcatca 66060
 aggatctaca agaagtggag tgaatatagg taatttcatt tactattgac aggggtataa 66120
 gtaaacacat cttattgaaa tataaatgt gcagccctt gatagactt cttggtatct 66180

193

gctctggaga aacaccacaca cgtgtgcatg tatacatatg tgatgtatat tgtggcactg 66240
 cctacaatag caggaattca tcgtaacct tgggtgtct cagtggagga atggctaact 66300
 agtctatgga agaagtttca gtaccttctg tttattgatt gcatactagg tgtcattcat 66360
 gattctaact gattcataca tattaatat tttaatattc ataatatctc tgtgaggtgg 66420
 gctctattat tatctgcatt ttacaggtaa ggcaatcgtt gttccaagag tgaaagtaat 66480
 ttgcccagg tcacagctag taagtgcagg aacaggattt gaaccacac agtctgggtc 66540
 tagctccagc gccctcaaat gctatatagc ctgcctctca atgtggaagt ggtagagcca 66600
 tgggcagtaa tatgcatcaa catgaacata tccatattgt atgtgagtg acaaaaaaaa 66660
 tatgcacaaa aatccatgtg aacgataaca ttaaagtcaa aaactcaaaa caatgctaga 66720
 tattgtgtac agaaagacag agaggagcag aaagagagaa cacacaaaag aaaactccag 66780
 gaaaaataaa aaactatttg caaaaaacaca caaaacttga catttgacct cacttctagt 66840
 tatgggagtt agaccagtgg tgtgaccacc acaggaactt atatgcaagg tggtaatttt 66900
 tacatgaaga acatatcaat gtgttgtgtg caattaaaaat gaatttattt tgatcatgct 66960
 tgttatgcct actgtacagc ataagacata tgagtaaaaa tactaaattg tatacttaag 67020
 aatttctggt ggatctgttc caagatggcc aaataggaac agtcttggtc tgcagctccc 67080

194

agcatgatcg atgcagaaga caggtgattt ctgcatttcc aactgaggtg cctggttcat 67140
 ctacttgga ctggttgga agtgggtgca gccatggag ggtgagccaa agcagggcag 67200
 ggcatcgct cactgggga gcacaaaggg ttgggggatg tcccttctc agccaaggga 67260
 agctgggga cactgtacct gggacactcc tgccaaatac tgcacttttc ccaaggattt 67320
 agaaacgagc agacaaggag attctctccc atgcctggct caggaggtct ggagccttgc 67380
 tcaactgtag cacagcagtc tgaaattgaa ctgtgaggca gcagcctggc taggggagga 67440
 gcgtccacca ttgtgaggc atgagtaggt aaacaaagt gcccggcagc tcaaactggg 67500
 tggagccac tgcagctcag caaggcctac tgctctata ggctccacct ctgtggcag 67560
 gacatagctg aacaaaaggc agcagacagc ttctgcagac ttaaacttcc ctgttcgaca 67620
 gctctgaaga gcacagtgt tcttcagca tggcgtttga gctctgagaa tggacagact 67680
 gcctctcaa gtgggtccct gacacctgtg tatgctaact gggagacatc tcccagtagg 67740
 ggccaacaga cactcatat aggtgggtgc cctctggga caaagcttcc agaggaagga 67800
 tcaggcagca atgtttgtg ttctgcaata tttgtgttc acagcctctg ctagtgtac 67860
 ccaggcaaac aggtctgga gtggatctcc agtaaacctc aacagacctg cagctgaggg 67920

acctgactgt tacaacggaa actaacaac agaaaggaat agcaccaaca tcaacaaaa 67980
 ggacatctac accaaaacc catctgtagg tcaccaatat caaagaccaa aggtagataa 68040
 aaccacaaag atggggagaa accagagcgg aaaagctgaa aattctaaaa atcagagcgc 68100
 ctcttctct ccaaaggact gcaactcccc gccagcaatg gaacaaagct ggatagagaa 68160
 tgactttgac gaggttgacag aagtaggctt cagaaggctg gtaataacaa actactctc 68220
 cgagctaaag gagcatgttc aaaccattg caaggaagct aaaaacctg aaaaatggtt 68280
 agacgaatgg ctaaatagaa taaacagtgt agagaagacc ttaaatgacc tgaaggagct 68340
 gaaaaccatg gcacaagaac ttctgaggc atgcacaagc ttcaatagcc aattcaatca 68400
 agtggaagaa aggggtgtcag tgattgaaga tcaaattaat gaaataaagc gagaagacat 68460
 ggttagagaa aaaagattaa aaagaaacaa acaaagcctc caagaaatat ggtactatgt 68520
 gaaaagacca aatctacatt tgattagtgt acctgaaact gatggggcga acagaaccaa 68580
 gttggaacac actcttcatg atattatcca gaacttgcac aaaatagcaa ggcaggccaa 68640
 cactcaaatt caggaaatac agagaacacc acaaagatac tcctcgagaa tagcaacccc 68700
 aagacatgta gtcagattca ccaaggttaa aatgaaggaa aaaatgttaa cggcagccag 68760
 agagaaaggt caggttacc acaaaggga gcccatcaga ctaacagcag atctcttggc 68820

agaaacccta caagccagaa gacagtgggg gccaatattc aacattctta aagagaagaa 68880
 ttttcaatcc agaattccat atccagccaa actaagtctc ataagtgaag gagaataaaa 68940
 atcctttaca gaaaaacaaa tgctgagaga tttgtcacc accagcctg cttacaaga 69000

195

196

gctcctgaag gaagcactaa atatggaaag gaacaaccag taccagccac tacaaaaaca 69060
 tgccaaattg taaagaccat tgatgctagg aagaactgc atcaactaac gggcaaaata 69120
 accagctaac atcataatga taggatcaaa ttcacatata acaatattaa ccttaaattg 69180
 aatggggcta aatgctccaa ttaaaagaca cacactggca aattggataa agagtcagga 69240
 cccatcagtg tgctgtattc aggagactca tctcatgtgc agagatacac ataggctcaa 69300
 aataaaggga tggaggaaga tctaccaaga aaatggaaag caaaaaaag caggggttgc 69360
 aatcctagtg tctgataaaa tagacttta accaacaag atcaaaagag tcaaaagaag 69420
 ccactgcata atggtaaagg gatcaattca acaagaagag ccaactatcc taaatatata 69480
 tgcacccaac acaggagcac ccagattcat aaagcaagtc cttagagacc tacagagaga 69540
 cttagactcc aacacaataa taatgggaga ctttaacacc ccactgtcaa tattagacag 69600
 atcaacgaga cagaaggtta acaaggatat tcaggacttg aactcagctc agcaccaagc 69660

agacttaata gacatctaca gaactcttca ccccaaaaca acagaatata cattcttttc 69720
 agcacgcgat tgcacttatt ccaaaattga ctacataatt ggaagtaaag cactcctcag 69780
 caagtgtaaa agaacagcaa tcacaacaaa ctgtctctca gaccacagtg ctatcaaatt 69840
 agacctcagg attaagaac tcaactcaaaa ccgcacaact acatggaaac tgaataacct 69900
 gctcctgaat gactactggg tacatagtga aatgaaggca gaaataaaga tgttctttga 69960
 aaccaataag aacaaagaca ctatgtacca gattctctgg gacacattta aagtagtgtg 70020
 tagagggaaa tttatagcac taaatgccca caagagaaag caggagagat ctaaaattga 70080
 caccctaaca tcacaattaa aagaactaga gaagcaagag caaacaatt caaaagctag 70140
 cagaaggcaa gaaataacta agatcagagc agaactgaag gagatagaga cacaaaaacc 70200
 cttcgaagg tcaatgaatc caggagctgg ttttctgaaa agatcaacaa aattgataga 70260
 ctgctagcaa gactaataaa gaagaaaaga gggaagaatc aaatagatgc aataaaaaat 70320
 aataatgtgg atatcactac caatcccgca gaaatacaaa ctaccatcag agaatactat 70380
 aaacacctcc atgcaaataa actagaaaat ctagaagaaa tggataaatt cctggacaca 70440
 tacacctcc caagactaaa ccaggaagaa gttgaatctc tgaatagacc attaacaggc 70500
 tccaaaattg aggcaataat taataggcta ccaacaaaa aaagtccagg accagaccaa 70560

ttcacaactg aattctacca aaggtacaaa gaggagtgg taccattcct tctgaaacta 70620
 ttccaatcaa tagaaaaaga gggaatctc cctaactcat tttataaggc cagcatcctc 70680
 ctgataccaa agcctggcag agacaaaaca aaaaaagag aatttttagc caatctcctt 70740
 gatgaacatc gatgtgaaaa tctcaataa agtactggca aactgaatcc tgcagcacat 70800
 caaaaagctt atccaccatg atcaagtcgg ctctatcccc gggatggaag gctggttcaa 70860
 catatgcaa ttgataaacg taatccatca cataaacaga accaatgaca aaaatcacat 70920
 gattatctca atagatacaa aaaaggcctt caacaaaate caacgccctt catgctaaaa 70980
 actgtcaata aactaggtat tgattgaaca tatctcaaaa taataagagc tatttatgac 71040
 aaactcacat ccaatatcat actgaatggg caaaaactgg aagcattccc tttgaaaacc 71100
 ggcacaagac aaggatgcc tctctacca ctctattca acatagtgtt ggaagtcttg 71160
 gccagggcaa tcaggcaaaa ggaagcaata aagcgtatc aattaggaaa agaagaagtc 71220
 aaattgtccc tatttgtaga ccacatgatt gtatatattg aaaaccccat tgtctcagcc 71280
 caaaatctcc ttaagctgat aagcaacttc accaaagtct caggatacaa aatcaatgag 71340
 caaaaatcac aagcattcct atacatgaat aagagacaaa cagagagcca aatcatgagt 71400

gaattcccat tcacaattgc tacaaagaga ataaaatacc taagaatcca acttacaagg 71460
 gatgtgaagg accttttcaa ggagaactac aaaccactgc gcaaggaaat aaaagaggac 71520
 acaacaaaat ggaagaacat tccatgctca tggataggaa gaatccatat agtgaaaatg 71580
 gccatactgc ccaaggattt ttatagattc agtgccatcc ccatcaagct accaatgact 71640
 ttcttcacag aattggaaaa aactacttta aagttcatat ggagccataa aagagcctgc 71700
 attgccaaag caatcctaag caaaaagaac aaagctggag acatcaagct acctgacttc 71760
 aaactgtagt acaaggccac agtaacaaaa acagcaaggt acttgtacca aaacagagat 71820

197

198

atagaccaat ggaacagaac agagccctca gacataacac cacacttcta caaccatctg 71880
 atctttgaca aacctgacaa aaacaagaaa tggggaaacg attccctatt taataaatgg 71940
 tgctgggaaa cctggctagc catatggaga aagctgacac tggatccctt ctttacacct 72000
 tatacgaaaa ttaactcaag atggattaaa gacttaaatg ttaaacctaa aaccataaaa 72060
 accctagaag aaaacctagg caataccatt caggacatag gcatgggcaa agacttcatg 72120
 actaaaacac caaaagcaat ggcaacaaaa gccaaaattg acaaatggga tctaattaaa 72180
 ctaaagagct tctgcacagc aaaagaaact accatcagag tgaatgggca gcctacagaa 72240
 tgggagaaaa tttttgcaat ctaccatctt gaaaagggtt aatatccaga atctacaaag 72300

aactcaaaca aatttacaag agaaaaaaca accccatcaa aaagtgggca aaggatatga 72360
 acagacactt ctgaaaagaa gacatctatg cagccaacag acacatgaaa aaatgtcat 72420
 catcactgat catcagagaa atgcaaatca aaaccacaat gaaaaacat ctcatgccag 72480
 ttagaatagt gaccattaaa aagtcaggaa acaacagggt ctggagagga tgtggagaaa 72540
 taggaacact ttacactgt tgggtggagt gtacattagt tcaaccattg tggaaacacag 72600
 tgtggcgatt cctcaaggat ctagaactag aaatactatt tgaccacga atcttattac 72660
 tgggtatatac ccaaaggatt ataatcatg ctactataaa gacacatgca cagtgatgtt 72720
 tattgctatt gcagcactat tcacaatagc aaagacttgg aaccaaccca aatgtccatc 72780
 aatgatagac tggattaaga aaatatggca catatacacc atggaatact atgcagccat 72840
 aaaaaaggat gagtttgtgt cctttgcagg gacatggatg aagctagaaa ccatcattct 72900
 cagcaaatg tcacaaagac agaaaaccaa acactgcatg ttctactca taggtgggaa 72960
 ctgaacaacg aaaacacttg gacgcagggt ggggaacatc agacaccggg gcctgtcagg 73020
 gagtgagggg ctgggggagg gatagcggtt gcagaaatag ctaatgtaaa tgacaagttg 73080
 atgggtgcag caaaccaaca tggcacatgt atacctatgt atccaacctg cacattgttc 73140

acatgtacaa tgataattta aaaaaagaa tttgctaaca agataaacct tatgttaagt 73200
 gctcttgcca caaaaggaaa aaactaaaca aaacaatact aaagggggac aggaagaagc 73260
 ctttgagggt gatggatata tttatggcat tgcttgtaat gatgggttaca ggaatgtata 73320
 catatctcca gacacattaa gtggtatgca ttggatatgt atagcttttt atatgccaat 73380
 tatacatcaa taaagtgggt tagaagttaa ttttaaaat agaaaatata cttgtttcct 73440
 gggtttcttc tgggtcattt ggtgtgtctg ttttgtgaag ggttgagacc tgtaccaagt 73500
 tttctgggca ctgtaaagcc ctagtattta tgatagggga ggcaggaaat tgatgaggca 73560
 ggggagatag gagagacatt tctgacata ggtatgcaaa aatgtgtcaa tgaagcatca 73620
 aattctgtaa aatatttga gagatttatt ctgagtgaag tatcagtac aatggacaaa 73680
 gccctcagga ggtcatgaga atatgtgcc aaggtggtca ggtgacagct tggttttata 73740
 cattttaggg cgacatgaac ctcaatcaa acacatttaa gaaatacata gggttggtcc 73800
 gaaatggcag ggttgggtag tgggggatgg ggtgggcaa gcttcagat tatagttaga 73860
 tttaaatttt ttctggttga caattggtg agtttatcta aagacctggg atcaacaaaa 73920
 aggaatgtct gagttaagac aaagaattgt ggagaccaa cttcttattt gcaggggaaa 73980
 cttttaggtt tctcttcag ggagactatg ttgtaaaatg tttctcatca gacttaaagt 74040

ctgtgttgat gttaacgctg gagaggtata atgagacaca cctgaaccgg cactgcccac 74100
 catggcttgg aacagcctct caggttaaat cttaaaagag ccttggttga ggaggaaatc 74160
 cattcggaag gttggggggc cttataactt tatttttgggt ttacattcat ggatttgtga 74220
 tacacttttt tttttttttt ttttttttt tagacagagt ctactctgt cgcgggggt 74280
 agagcgaggt ggccgatct cagctcactg caacttctgc ctcccagggt caagtgttc 74340
 ttgtgcctca gcctcccag tagctgggat tacaggtgtg catcaccacg cctaattttt 74400
 gtatttttagt agagatgggg ttccaccgtg ttggccaggg tggctcctaaa ctctgggg 74460
 caagcaatcc accttggcct tccaaagtgc tgggattata ggcatgagac actgcacctg 74520
 gcccgatgata cacttattta tccatctatt tgtttatgcc tagccgactt tagaaagggt 74580
 tgaatgtggt ggacaaaagg acatcgacgc caaagtattt taagggtgaag aaatataagt 74640

199

200

gaaggaaaa taagtatagg aaattgcagg agggaaagtc caggaaactt gtttagaggt 74700
 cagacttgag acccatagcc agaggggtgac atgatgaatt acatgtttca ccatattcac 74760
 taggttaaaa aattagctgt ttgctcgtgg aaaatatgtc tagttctggg agacactgtg 74820
 taatatcatc aagagtgtcc taaattatca gaaaggcagc aattaatatt atagtgtctt 74880

tctaaagatg taaaacaact tattccctca ctacaaaatt aagagaggct caacataagg 74940
 tgcttgaaaa atcctcatca tcagtagctt ctgggaaaga tgaaagctta gaaacacatt 75000
 agccagctgc cttcctctgc ccaggcccaa cgaaagtcac tgaagaaatc taaaaacagg 75060
 gggagacctg catctggaat gagagccaag gaaagaagcc atccaaatac cagaaacttc 75120
 taagaattcc cagcacacga gggagcagat gaaacacgga agccaagtgt ataagtata 75180
 attcagcccc cgggagaact ccctggcctt gtagaggatg aactgatact cacaagttaa 75240
 taggggtgagg gcagccggtg agaacgcgac acgagagggt ccaggaagcc caacgcggga 75300
 gtcatttttag taccgcagct gtgcagaatt taagggcagc tgagaggcag ggttcggagt 75360
 ttatcggtc cagctgagag aaagccgtag aaagaagaga ttccccgaga gtggcagggc 75420
 tctctgggag agtcatggag caggagagaa ccaggaggga gtcaaatgta gctgtgcagg 75480
 cacaaggcaa tggccgctta actgagggga ggccatattt tatttatttt ttactgtat 75540
 ttactgaagc agtatttttc ttgccagca actccagaaa agttgacaat tttaaaggtc 75600
 ttcacaaaa atgaatatga gaataattag aaaaatatca aaataataa gagaaatatg 75660
 cagtgttata ttaaaatgta atataaaact ttgataatta aaacaatgtt ggaaccagaa 75720
 taacacatat aaatcataca aaatttcaaa tcagttggca aaaaatgaat tagtatacgg 75780

tgttgaaata gctgtctggc cttttttcag aatattagat caccaccac catagcta 75840
 aacaaagtaa attttagttg gattgaaaaa attaacactt caaacataaa aggagtaaaa 75900
 gaatatattg gtaacacctt cataatttca gtgaaggaaa ggcttttcca ggaaccatat 75960
 caaaagcaga agcaagaagg aaaatatagt tttttactac ataaaaattt aaattattta 76020
 tgtaataat aaatatccat aaacaaactt aaaaagcaaa attataaatg gaaaatattt 76080
 ttatgtaaca ggcaaagaaa aatatccttt ttataaagaa gtctggcaaa gaaataaaaa 76140
 cattctaatt ggttaaatgg gcaaagggca tgaacagact aacaagaaac aaagaaacat 76200
 aaatgagacc aggcgctgtg gccacgccc gtaatccag cacttcggga ggtgagggtg 76260
 ggtggatcac ttgaggtcac aagtttgaga ccagcctggc caacatagtg aaaccctgtc 76320
 tctactaaaa aaatacaaaa attagctggg catggtggca tgcacctgta atcccgtac 76380
 tcaagaggct gaggcacaag aatcgcttga acctgggaag cggagggttg ggtgagtga 76440
 gatggacca ctgcactcta gccctctagc attggcaaca gagcaagact tcaccagaaa 76500
 aaaaaaaaa aaacaacac cataaatgaa tagaaaatgt atagaaatat tcattttgac 76560
 tactaattaa agaattgcaa aattgaacat ttggatacaa aattttacca accacataac 76620

aagattaaaa ggaagaatta tccaactatt aggagagtat aaggaaattg gtacttttgt 76680
 tgttacagt agagccataa atagtaggca cttttgagg aaatgtaaca atattgtca 76740
 aaatttataa atcttctgtt tctaagagt taccctaagg aataacaaga actgagaaaa 76800
 atagatgaat ataaattatt tataataaaa aatggaaaac aacttagata ataactggct 76860
 attgataaaa ttggagtaca gtataaccac cggaaaaaat gttatttctc agtgcttttc 76920
 caattgcaat tcccacagt acccccagag ggcctcatctt gctggcctgc tccagggcag 76980
 atctgggagc tgcctggctgt ctgagtttca accaaagata cctgagcttt caacactttc 77040
 ctatactggg ttgagataa aattatattt gaagaaagga tcttactacc tgaaaaaaa 77100
 tgccacttgt acaagttcat atttctaac aggaagagat ggtcataaca ggcttttcag 77160
 aggaaaaaaa ttaggttaca agtaggac tgtatcatga tctcatttct aaatgtgtaa 77220
 tctatgtatt atatatgcat gcgttatcaa aatttaagct tgacgtttct ggttggtgcc 77280
 actatggatt ttttccttt tcgcttattt ttatttgcta gtgtttctat aatcaatgtg 77340
 tgtaacttat acgattttat aaaaaggtaa atgagttaca tggaaaagag gaaggctaag 77400
 cggcagagaa gtacagaaat ggacaagagc acatggaaga gggagtctga cttccgggg 77460

201

202

gtgagaaaca tgagacagtc taccttatat gcaaacctgc atttcatctg ttcgatcctg 77520

gatcccttcag ccctgagaag tcactcttca tggcaaatgg gctcagctgc ctggaaggcc 77580
 atcagttctcc ctgctgtggc agctgcgtca cagcctaaga gagggtggct ttcacagtgt 77640
 agccccagca ccagtaagag aaaaacagct ccaagcctat accctgtctg gcctttgggg 77700
 aaacatcttc ggagacctg gtagaattga ttctaaagta tgattctata ctctcttccc 77760
 tgtccatccc tctcaaaagt gaatgcactg ttcattccatc aagtggaaac tttgtggggc 77820
 ccaggagtca cacgttgccc ttaagagtgc cctggaacct atagaagaag atgacattag 77880
 aattctaacc attgaaagaa caagagcaca gggggcagct actaatgtca cccaggacca 77940
 tagaaacca tcaggcttca cccccccc atcaagaaga accccctcca gtcctattac 78000
 ctgccctctt catcccccc tgettcttct ttaatctgaa ctcccactgc ttctctccac 78060
 gcctggtttt tctctgttcc tttagggacc agctccccca tgccatcaaa ctccaatagg 78120
 gaggtccct ccacctcctg cctcctgagg tggctgattc ccttaagaca tctcaaggag 78180
 atgtcctca accttcttt ttaggtacct catggcctgg tgggtgtgaa gacattttcc 78240
 taccgttcta gaccacctcc aggccttttc tcttcagta ttgcatacgc atgccctctc 78300
 tgtttctctg atgtcatgc tatcagtcta gactaccttc tacaacctt ccccatatgt 78360

ctgtgcccat atggccatgg cctcatcca gtgaagatgt tgacactatt ctgagttctt 78420
 caccittcat actgtctaa tcacaggtga ctgatgtct acataaacta agtctagtga 78480
 gagggcttca catgatgact cacagagctt gacatgttcc ctgcatttga aagcattgtg 78540
 gaccaatgac tacatcacac ctgagaatgt tgaagagaag ctggctggcg ctgtggtcct 78600
 agcccagggg gctgatgtaa aacctgcac atgaagtttg cctgaggctg tgttaaaaaa 78660
 gatcctgcc cagacatttc tgccagagaa agaggcctcc ctgaaggta ccaggaggag 78720
 tgggaaggta ctgcccaggt caaggaagt gccaccagca agaccacaca ggataatttc 78780
 caaaggacct agaaaagttc ctccaggagc caagaatcag ctttgatgc agccaggcac 78840
 agagagcaca aagccctctg atgacagcag cagtcaagca agaactctgt cttcttctc 78900
 ctctgggttc cctgtacccc agtccagag agaccaccaat gtggatagca acctggggga 78960
 ggaggaggaa tagcagacaa ggatagaaag cagaagggt ggtacctctg ctggacttcc 79020
 tacttgaagc aagccacct agggagaaaa gacttaactt gaaactttct tgggaatttg 79080
 gggttttttt attgttatct aggatttta ttactaattt tcatgtaatt attaaattga 79140
 ccaatgttta ccacttaatg tgtcagtcac ctgtgagta tcaataacat caagggaatc 79200
 gaggttccaa atgcaggcag gaaaacctct cccctgtcc ccagtggatt accggttgca 79260

tgtaaggaac aggaagacc ttaatcagat tgctattata attctacccc aagactcctg 79320
 cttgtctcagt gggccaataa caactctttt ctacatgaat ctaatatctc ttttcagtgc 79380
 atacaattca ggaagaacag aaccttagat attattctcc taaatatattt gggtttggat 79440
 tttaatagag tccctagttt cctctagatt ttctcactt ctgtagctc gaccacagtc 79500
 aacacactgt cgaacaacac cactgactc tacattccaa cccacccaa agacacacac 79560
 ctgctttcca agttgaaagt aggggagcaa ggtggcctct tatttctgga agaaggctcc 79620
 agagccaatg agcacagaaa gccagctag gtgagggtt aagatgagag tttcaacaac 79680
 agcttgacag aaagcatcac atcatacaa cgggtgtatt ttaaaggta ttgcttatgt 79740
 attaatgtc tctctccagc cccatcataa ccagctgagg tggccagagc aggtattttt 79800
 tataccaatt taaagaaaag atgaggctga gactgcatgg tttagccaag gtcagaatat 79860
 tgcaactaaa gtccagtgtg cagacatagc taccaggttt ctgggctggt tttgaatgca 79920
 ccctactctc cagaacgaag ttcagtgttc ttctctgcc ttgtaagtc acccatgttc 79980
 ctaccaaaaa aaaaaaaaaa gaaagaagtt tcttcccat ttggcaata actctcaaaa 80040
 actgtcccag tgctttgcag tgctgggtac agtgaagaaga tgccacgtgg accaaaggct 80100

ctagccctgc ctggtaacaa gagactgcat atgggtagac acaactcagc atttgaccg 80160
 caactacca aatgtacatg gtacaaactg agctccctaa tactgcagga atggatgcgt 80220

203

204

cagcatctca agtcagatgg gtaaatcagg aaagaaaaag caccaacctt aggccaggca 80280
 atgtgctgge ttctgttcaa gttcccttt gtaatcttca cattgacaat gtatggagat 80340
 actgtatccc tgtttacaga gaaggaaact gaggtcttgg gaggttcttt gaggtccagg 80400
 gtggctgccc cacagtgate cttttctata gcagactcca ttgtgtctcc aaaaatggtt 80460
 gccacatacc cagacattcc tctcttttct ttgggcagaa aagcaagcca gggctcctcat 80520
 tgtgatcgcc tggagcctgt cttttctgtt ctccattccc accctgatca tatttgggaa 80580
 gaggacactg tccaacgggt aagtgcagt ctgggcccgt tggcctgacg actcctactg 80640
 gacccatacc atgaccatcg tggccttctt ggtgtacttc atccctctga caatcatcag 80700
 gtaagaagcc gtcaggacag gaccacacgg ggggggtggg cggggggggc tttcctgttt 80760
 ctccagctgt tgctctctc cccaacagac ccatttttcc tagtgccctt gagggaaactg 80820
 accaggccac aagattttat gtgtagctac cataggetaa gcccatttc ttcaaagtag 80880
 agtaaggaga agggaaattaa caattactgg gtatataggg caggcattgt gctaaatagc 80940
 taacaattat cacattagcc acagtataac cctgtgaaat aatttccatt gcccatttt 81000

aatgaatgat gaaactcaag ctccagatga ttaagtaact tattcaacat caaacaggat 81060
 tgatatccag gtttttctga aatcatacca tattatttct tttatatctc gcagccttcc 81120
 aaatataagg caaattacca gtttcaggga ttttgtaaat gaaaagatag acatacttga 81180
 aacaaactga acacaaaact cagtatgcac taatatgcta aactgtctat gcagtggagt 81240
 cagataatgg cagggaatat attttggag ccaccattga aggaggaaat gattcaggta 81300
 ggataaggga gaagtgggga ggaagcagag tctgtgatga ccagaaatca gagttagtgt 81360
 agaggcagag tggacaggta cacagtgcga gtgggacaga agttggcagt gagtcctccc 81420
 cagtgtactgg gggaggctca gttgtgaatg acctggcaa aaaagtcata ggaagtcctt 81480
 tgtctcgag ccaatgggtga gctgtagagg gtctttcaac agagattagc acaacaacct 81540
 ggtcaaggta gggctcact tggccatgcc atgtggcagg atcaccctct gaaatgggct 81600
 ctgcatgtgt agatgggggt ggagactaca ggaagagacc tggcacattg tgtgtatcct 81660
 tgagccatga tgatgctgca cttttgggt aggtctaagc ctgccatagt gtgtcatata 81720
 acacattgta agcaaaggaa gattatcagc cttgttttt gatagtgtaa agagagctgt 81780
 gataaaaac cttgtactta aaactgtaca tgagtctctg gttatttct cataactcat 81840

tcttgtggaa ttactagatc aaaggtag atcaaagatg atgcacattt taaaactttt 81900
 gatgcagagt cacaagctgc ccttgagaaa agctgtattg cttcttggcc tgttagctaa 81960
 gatcacttgt agaaaaggta tattctgggc aataccatac aagggtcttt gttttctgct 82020
 cccctgacce aatggaaggt agcactatta cttactaaa tctttgcaa cctaagagtt 82080
 taaaaagtat ttcattgttt taatatgcat ttctttaatt actaagctgg tggcatgttt 82140
 ttcaagtgtt ttctgataca gtgggagtc ctttttctg ctctatttc atctttatgc 82200
 taataaaata ctatagctgg gagaaacgtt atccatcata tggtaaaacc cctgaatttt 82260
 tcataagagt agaattaaga ctaaaagaag ttaactgcct tgccccgcc cctcatcag 82320
 agattgagat gggcaagcac atagtacat caaaagcca ccagcagcc ttccaaaat 82380
 ggggtgttgt ccagtcatt ctgctgaatg gacaacttaa caccaacct ttattttgac 82440
 ttattgccct ccaatccatc aagctgagct tgagagaaag ttgaaggag aaaagggtat 82500
 ttagacaact atccaaggta agtcacagcg catgggaagg ggcccatggc agaggagaca 82560
 ggcaagttag ccacagcggc cagagagcat ttggaagaa ~~gtggctt~~gtg tcatccttag 82620
 caactgagge atcgatttca gtggcagcac atgtcctggc ttactgtctg attgatttcc 82680
 catcaactca agaaatgaac tccagtcaaa gtccccgctc agcagagtgg atgctgcagc 82740

acatggacca cgcagctcag gttatcctgt atctatgatt tccccattaa tttgggctgc 82800
 tttttccacc aggacttctc ctcaaacctt cctgtgggct agctagtgtg tctttttcgt 82860
 gtcccttgaa gggcaaaaata caatgtgttt gctgatttag ggaaatgatt tcaaaaactg 82920
 gtttccctca gctctacca agctaaagcc tctggaaggc cagatcctag ctcttctgct 82980
 ccagcccgtg acggctcatga aaactcagcc atgacctcca gccatcctt agcttctctg 83040

205

206

aagcatttcc tacctgacaa gaggtcctc ttccatcacc ttcctctttt cgtggctccc 83100
 tgtgtctgaa gaaacaactt ctctcttggg gactaacatc ctctacctcc ttcagcaaca 83160
 actatcttct caaacaagac caggccctgg gggggcgagt tttgtgagga acttgtttcc 83220
 aactagtacc tggcataggt gctacaattt catctcagat ataaggttca actcttattc 83280
 tgtcttttatt acctatattc tggccccctg ggctcaattc tctgagtaag gttaaattct 83340
 tcatttcaag cttaaataga caaggaaaac agctcaagga aagtgttcac tcgtgttcac 83400
 catgcctcat tctccttcat gcatgctata tatgctacat ttaccaaatt gacagaaaaa 83460
 aaaacataac ttagttgttt tattttgcat ttctttcatt acaaatagaga ttgaatatat 83520
 tttatatgct ttttgccatt tttgtttttt ttaaagtact tattaggttg gtgcaaaagt 83580

aattgeggac tttgccattg aaagtaatgc cacttttctt gtttaaagt ttttattttc 83640
 tctattctct atcttttagaa attattcata caataacctt tttctttttg catatgttgc 83700
 aaatatttct cctaatttgt catttgctc tctattgagt atggttttat tttgtttttg 83760
 attattaaaa gtagtgattg acgtaattaa gaaaaaaga aaaagcacia ataactaact 83820
 cagtggcttt tctgccacia atacctcatt gttttactta ttgccagct tcgtatgcat 83880
 ttaagtatct gctaggacia gatctacttg ttttttttca aagattccct ggctgcttca 83940
 tggtagctg ctgatgcctc acctgcactc ccagctccag ccagtggaaca aacacccctc 84000
 tggcccatgt gcatcactcc catgcctgaa cactctgcca agctcacctt gccttggttc 84060
 acccaactag ttcacatccc ttgtgtctca tttccaatac caactccaca gtagagcttc 84120
 ccttgccaac cctggacca gaggcacctc aggtcctcac tccctaacct ccaacctcac 84180
 tttgtccatg tcgtcatcta gacttcatgg cagtttgact gtatctcatg agtgacggga 84240
 ctgtggcctc ttcatttctg gatttcacat ccagcacaca ctaaacagtt ggtgaatatt 84300
 agattgaatg aataacgcaa taaattgcac cgaacaacag atgtgtcatg tcaactcttc 84360
 tactctttct ctccctctct cattctctct ctctctgtct ctcacacaca tcacacacac 84420
 acacacacac acacacacaa acacacgtgt acacatactg ctaatataga aatttctggc 84480

tatctaattg ctagatcagt ttttggcata tgatagctcc tccataaata tatgtgagag 84540
 gaaagaagaa agggagaaaa gaaaggagg ggggaagaaag ggaggaggag aaagagagag 84600
 agagagagge agttgtattg ttggtggcaa actctcatga gagctgcgta tgaataaaga 84660
 tgtagctgtt ccacatcca ctaaatcagg ctcccaggag ttgaaacct agtgactgac 84720
 agcaaaggca atacattgtt tttctgggtc aaaacaacag gagttgtttt gaaattcact 84780
 tgacataact gtctaattgt tgcctggggag gttattagcc ctggtgtaat tgctttactt 84840
 tagctgtgct tattttcttg ctacctaat gatttttcat tctcttatca ttttcatctc 84900
 tgtaagataa agatagaagc agaagagatt cacaaccgac aattgcaaaa aaaaaaagt 84960
 gaaaaagcac attagtcatg gatcattgat ttgtcatatg tgagaaaaat tcatttattt 85020
 tgcttaggaa atgggatcac attgtgggaa agcccatgc caggttggtg cagccctgtg 85080
 gatagaatac atggccatgg tgggtaaaag cgccccaggg acctggccag cactggccat 85140
 gggcataagg tccaaggatc aagaggatca caggggccac aataaaagta gtcatacaaa 85200
 tgaataaaga gagattgtaa gggctccac taatgctgaa aacctggatg gagaggaagg 85260
 tacagattat ggagtcattt tgcagggaca atccacaaaa cttatctgca atctgattga 85320

tcagataaag gaaaaaggaa aagagacaaa gccaaagtgtg gtgactcaca cctgtaatct 85380
 cagcactctg ggaggcctag gcagggtggac ctcttgggcc cgggagttca agaccagcct 85440
 ggcagcatgg tgaaacctg tctctataaa atatacaaaa attagccggg catagtggcg 85500
 cacactggta gttccagcta ttcagggtgc tgagggtggga ggtcaaggct gcagtgaact 85560
 atgactctga cactgtactc cagcctgggt gagagagcaa aacctgtgt ccaaaaaaaa 85620
 atggggacac acagcaacgc agatgtctct ttgatgttg atcactaagc tccaagaagt 85680
 agtctgattt ggcaataata cctagttat taggtgttcg ccatgctaac agaaaagt 85740
 gtactgggtc tcaactcatc gattggccct aagtaaaaag aggggtgact taggccccaa 85800
 tccctaaagc ataagacatt tcttaacttt tcccctgtgt acatggttga taaccataaa 85860

207

208

tatttgaatt attggtcaat taaatactgg ggttgcaatt gacataacca ttaactttcc 85920
 atggtgagtg taaccttacc ttgcacagta tttcactttc tggggaagaa gtttccctgt 85980
 tctagcaaat agtcaactta gggttgaact cactaataac atttttctca tttttcttt 86040
 actgcaggca tacaaattgc aaaaatagtc cctgggcaat tatataagaa agaattggaga 86100
 tgctccaaaa aagtcctga gcttctctgg agcacttgga ggggttccact cagcaagaat 86160
 gggaaaaggc agtaagaagc agagatttta acattgccat taattaagtt atattctaaa 86220

gatcattaaa agcaattagt gctttgtcgg ctactgcaaa ctgaagctct gattttttaa 86280
 aataattctc aagagggaag atacacagtt ttaaaataaa gcattgcttt gtcccaaagt 86340
 ttttagtcaa gatgcttaat gtagtcaaaa tatcaagtaa tattaagaa gagtagtttt 86400
 tatatttctc aaagagtacc taggataaga aacttgctga cacttttgaa tccttaacac 86460
 tttgttttcc tgtaggcac agattaaatc atgtaagaat tgggtgtgata tagtataaaa 86520
 aataggcaaa aaagaggaga aaggaaatta gtctctacta attttccagc accgtacttg 86580
 gcactttaaa tattgtcaca tctgatactc aaaaagtgc agaggtctgt attgttaaca 86640
 ccattttgta gaacctcaac tgaggctcag tgtagtagtt atctattact gcattacaaa 86700
 tcaccacaaa cctagtgaact taaatcaaga tacatttggt atctcacagt ttctgtgggt 86760
 caagaatttg gccgtggctt aaccgggtcc tctgctcatg caaggcagcc attcaagttg 86820
 tttatccagg gcaggggtca tcagaggctg gactgggaga ggctctttc caagctccct 86880
 caggctccta gcagaattca tttcttgca gctgtgggat tcatggcacc ttgcttctc 86940
 aaagccagca atgcatagag acaccaaaa gacaggcact acattctatg taatcagtc 87000
 catcccttt gccacattgc attgattaga ggcaagtcac ctgctcttcc cactactaaa 87060

gggtgaggat caacaaagcc atgaatgcc gaatcaggga tcatagatgt catttaaaag 87120
 actgtctaaa gtcaggactg tacaacagac aagtagagga gaccaagtt tttctgactc 87180
 taaggcctgt ttttgattc taatcacagc tctccctcaa accatttggg ctaccttgag 87240
 gaaactgcat aactttacca ggtcttagcc tcctcactta agaaagaagt aactccatcc 87300
 agtggatcct catggtcact ttcagttgca attctatgaa cagcaagtat aagggggcag 87360
 gcattggttaa agatctgtc ccttcacacc ttgcactcgg ggaggtggga gtggtcttct 87420
 ctgtgtctc acagtaggga tccaccagtc actttaatac tacctttggt tctttctgca 87480
 gcattcatgta tggcattgtg atccgaacta tttggattaa aagcaaaacc tacgaaacag 87540
 tgatttccaa ctgtcaggt aagtctctac tctgcatggc ccaattcttg gctaatttgc 87600
 ttctccagag gttttcttct agcaaatgtg agctagggac tccttgatac acaagcacc 87660
 aggatcatat caggaccag ccggcagacc agaccacca aaggtgtgca caggcgggct 87720
 ctgtcttccc ccatgtgacc tccctgaaat ctaggagaag gaagggggca ctttgacct 87780
 ggtcaagcta tgccagcaga gagttagcct ttgacctagg atccaagggt taccacagcc 87840
 tcagatctag caaagaagca ccttgaggga cacagataag aaaagacaga ctgtccaagg 87900
 aggacatcac accttcagca aagatgagca taggctttc tgattggctt gaattttcag 87960

atacataag ctgccatctg tccatagaac aatcttggac ccttagccag taaaggcag 88020
 gtagtccatg ctttcccaac tgacacacca attcaaacca gatgaagcct aagaccacct 88080
 actacaactc tccccacat tccttctcag taaacctgaa tgcagagcct ctctgatgca 88140
 atagactctg agccctggaa gctaccctg cttccagga aaacattact ggacctgacc 88200
 aaggtaaac tggagaaaac acagcaaac aaggggccaa aagaagaaag ggcttctagt 88260
 tttctgtgc tataatgtga taggtctgca gaagaagact ggctccgctc agcttccaca 88320
 cccctcccat tccttggtgca cacacataca cacaatgtag gctcatatac acaatacac 88380
 acacttcac aactcagtc tcacacacac taacaatgca tactcacact tatatgcaact 88440
 cacacaagga caacaagcta taccacaaat atctggaata agaagagcta ctttctgttc 88500
 cagatgtacc actaagagct gtgccacctg gcaaagttat ctaatccctg ggctccaaga 88560
 ggttaaaata aggggataga ctggattctc cctaagcct cctcttttca gactgtgagc 88620
 taaactttt ttggaccaag acagagcttg tttctccct cttaaagcta ctttttccaa 88680

209

taagactgtg aggccaccaa gaggatgcac aagtattatc gggcactgat aacttgtgtc 88740
tctttcccta gaagtatgag tggagataca taagtctggg ttcttcacct gaattcagtt 88800

210

caattcttct gtactcttct gcatgtcagg agtggtacag ggactggaaa tgacaaagaa 88860
tgaatagcat ggttcctgac tataggcagc ttacagtcta gggccttggg tcttggccct 88920
ggctacacag tagaatcgcc tggggagggt ttacaatgca ccgaaaccca gacaccattc 88980
cctgagagat tctgattcac tccatctgga gtggggcatg gattttatta ttctggaaaa 89040
gctcttcagg catttttaaat gttcaaccag gtttgacaat ctggtccagt gagacacaga 89100
gtcatagggt gctgacctc acactgactg accagtgtaa ccaagagatg tgcttaggct 89160
gcttggaaat ttcaaccca cgaagacca gtcattcage ttggggctaa ttccagcccc 89220
catgcagatc ctagtcttc ccttccactg gtgcagtctc cacaccctgg ttttctgga 89280
agagcaaaag caatcagaga gaataaacac aagtgaattc attctattca gtgcagttgg 89340
ctttgggtta aggttagaat atttgtccaa aaaaaaatt ggatgaagac atccttccctc 89400
tatcagatat caaataaatg cagtaagtac tataattata atactaaaat cattgaaaga 89460
gaattatatg gacagggaaa tccaacagaa cagaaatgcc aaaggaaacc tcaggaaattt 89520
agaatgtgat gaagtatttt aaactgatat agaaaatagaa actgtttaat tactaatgtt 89580
gagacaactg cccatatgga aacaatcata tattagattg ttgtatcata tgctacaagg 89640
aaatacactc cttatgaac gaagaacaaa agatagaatg agggagaaag aaagagtgg 89700

agagaaagag tgaggaaaga aaagaagaaa gaaagaaaga aagagaaaga aagacagaaa 89760
gaagaaagaa agagagagag gaggaggagg agaaaggaag gaaggaaaga aaagaaagaa 89820
aggaaaggaa agatgggttag aagaagagag gcggggggga agaaagagaa agaaaaaat 89880
ataggaaata ttgtttatat tcatgaaaaa ctgaaaagat ctgaatatcc tacaatgagg 89940
gaactgagca taataattat atagccatac aattaaatgc tacagctcta aaaattatta 90000
tagagagtgt acttattgcc atagaaatat ttctccaata tagtacatta agaaaaagaa 90060
agcagtatgg tatccctttt atagatatgt gcacatattt ttacttagcg gaatatatat 90120
gtgcctgtat agacagatga tagctagaga gagaggaga tggaaaatat caagaagcta 90180
aatgttatca atgttattgc agttatctct gagtggctga attttaggtg atttttgttt 90240
tcttctgttt tccacttagc catgtgttaa aattctctac agttacctaa atcatacaat 90300
tgaaacaatt gccctgtggc cctttagcct gagtaaacag ccaatattat cctagatgta 90360
tatatgtata ttcatTTTTT aaaaccatca agtcaggccc caaaaacat atatttgcc 90420
tgcacttctc tgtataaatg tcatgcttag accctctaag gccactcaa agccatcgtc 90480
cactcatctc aacacagaca gacaagtcag agggacagat ggagcagctc ctgtctgcc 90540

ctgctaggct ctttccctgt gttcttcct ttaactcatt tctgtttgc cccatttcac 90600
ccatggccca ttgcccattt cccatttaac ccatttcccg tttgagaata ctgcacaggc 90660
agttagttgc actttttttt ctaaacagta aatgggttaa tccacaactc tttgagggtg 90720
tgttattaac tgtctctcac agacagaaga caggctctaa ggtaagcag tttgcttgtt 90780
ttcacaggta gcatgtgaca caactggtat tcaaatgcac acatatcgaa tgcacacata 90840
aagacaagac tttttaaaaa ttaaaaacac aaactcaggg tcttgggtgt ggcttccttt 90900
cctggacact cctccagag ctctgccttc agagagctat tcctacctca tctcttgag 90960
gttttgttt gatataatta aaatctaaag gctgagtcag gactggcagt gtggagacca 91020
attttgtgga ggtagccaag gtcttctgt actttcagac gaatcagatt ggtgtaaacc 91080
cctgtcttgt ggtttctgcc aattccatgg gtctgacatg ctctccctg cttgtccctc 91140
tgagcactca ctctactgt ctacacctc acagctctcc tgttccctcc acagcagcac 91200
cgcccttgt caccacctc ctacagatgc cccccccag ggaggtgac ttcttggtc 91260
tctccaaagt tcccatgtct cctgctacta catatgccag tcttgcact cttgggtccc 91320
cctgacttcc agtcttgaa actgtacaaa gccacttgga ggtctgtttc cactgatata 91380
agagtatgcc attactccct cccaaagggt gaaatggcta ccgccacttt ttattcttta 91440

211

212

atatatgtttt atatctccat tatatctatt tttcagttac cattagtac ctcaccccga 91500
 aatgagggca gctgggtatc tcagaagctt atatgctctc tatatcttat tcgtaaaagg 91560
 aacacagttg atttcccatc tgtcattaca gccaaagcagc tctggagttg gcaggtaaat 91620
 cggatctcca gctgggtccg catgccagga ttattgctca tcaacaaggg gacattagcc 91680
 atgattagtg tgaacagaag ctcactttgt aaacactggc taaaaagctc aagccatcct 91740
 tagtgcgaga accactcttc ttactggcaa atatgtctat tttctcccag tcaaaggctg 91800
 acagaaagga aaagaaaaag aactgtatca taaattatct aaagactttc ccataaacia 91860
 gcatggaggg caagacgtgg aggagatggg gtttccaate ctgtatgtta tctttcataa 91920
 atgagcatat tatgtatgtc caggaggatt tacttgtaca aactagaaca tttactgcat 91980
 gggcaagtgt acccatggaa cagacaaatt tctcgttata actatgtcta gctatcatgg 92040
 cttggtggat atgatccatg ctatatccaa attccatggt ttttaattaaa tgaggcatac 92100
 tagagtgaag aaaaaaagct atggattagg aattgggtta gagccctatt cactttctag 92160
 cttaaaaaat ttaagagaag cccattaact gctgtccata tcagcttctt catcagtaac 92220
 tgtgaataaa atggcttctc tacaattaac tacatttaac aaaagatgtg acagaaaaac 92280

ataaagatac aaataaatga agattatgac atgttcgtgg atagtaaggt tcaatatcat 92340
 aaagacgttg aatctcccca gctgatctac aagttaataa atttccaatc aaaattgaat 92400
 tgaacatttt tatagagctt cacaagccta ttttaaaata gacaaggaaa attcaagaga 92460
 catgagtagc ctagacattc ctagagatgc agaacaaggt agagaaagtt cggtttacc 92520
 aatattgaaa tgcattgtaa agtcagagtg cggatttggc acaatagaca aatggaaacc 92580
 tcagtttctt tgctacctgc tgcctgccc acaatccaat gctacatgtt tcaggttttc 92640
 attaagacag cactgcatat gaggtaccaa tctctacttt agaagggaaa cactagcagc 92700
 tgtgtaaacc caaaatatca gtacgttaa ccacatagaa gtttatgtct taattaaaat 92760
 ccagttggca ataaagacca gagggaaagg cattgttcca cacagtcatt cagaaattca 92820
 agcaggtgga gattctgcca cgcttaacag agggctgcta aggtactcct cagcacctcc 92880
 ctccagcaag caggggcagg ggaagagaga gagtggagga ctgctcagga gaggtatctg 92940
 agcaagggtt ggggtggtag acattgactc tcccagcgt cccttaggca gatcttagtc 93000
 acatgactac aactgctgg aaggcaggct gggaattgta gtctagttgt gtgccctggg 93060
 gaaacaggaa tgggttttgt gaacagctcg tctgtctttg cataattatt ttaggtgtgc 93120
 agggctcctg cttctgcttg agctgaggtg ctgaggtata gaaagggcta tctggtgggt 93180

taggtgaaat cttctcatat ctagctacaa tttacagttg gctctgggct aaaaacctcc 93240
 tgaaagggaa tgcaaaatc tttctactt gaaggttcag agatatgcag ccattgccag 93300
 ctaattggga gagaggagc acctcagatg acaagaaagg gacaataaga tccctgaatg 93360
 tgaaaacatt ctggagaata cagagtcagg cacaacaggt gccttaaggt caaagggaaa 93420
 tgtaagttct gggtcacaga agaacttcc cacctaacca gtctagccac ttgtcagcat 93480
 ctaggaggga aaacgctgtg tgggtgggcta aagaagctga aactcttggg agttcaagag 93540
 agtctgctgc aagctcctgg aatagcacag cacagaggag agaggccatt ccctgtcttc 93600
 ctggcagaag aacttggaga gcaggtatcc cggggaagag cagcagtgct gaataacca 93660
 cagcccaggg acagaactga ggccttgaga ggtggagcag aagagcaaag caactgtctc 93720
 gggtaagag caataatgaa gaggactcac aatgtggctt tgaagtgact gtggctgtgg 93780
 agcatctgct gccagccgg agccctcaa gaggcagtc ttggcaaaga agaggtctgg 93840
 gtgaagtgc ctggggcagc ccagggcagc tgcagcgagc ctgaaagca ggatccagag 93900
 agcgtcacca tagaggcaca ggcgtgggcc tgggtgggac ctggaacact gagacacctc 93960
 cttgggtctc tcagaaaaac tagagggaca aagacacct gggaagaaac tgactgcagt 94020

cctgcagcta aacagatgag acctaatgtg cttaaaaatc tgaactgatg agttcagggg 94080
 gtattcaage tatattagta aagagaatgt tactgttcaa aatgaatttc aagtttcaag 94140
 aattttagaa atcaggaaaa actgctaaaa ataattgtga agttttttaa aatcaacctc 94200
 acatacacaa agtttcta ataggaagca tatttatattt aaaatattgc cagttagact 94260

213

tccatgtttc taaacaaatc acctgcactc tttataggtc cacagatgaa ttccccccac 94320
 tacctcccag gaaacaatc tgcttccatt tgaatccca aggtaccaat tgctcccact 94380
 tcaggtgtc agcctgcatg aagaatgggt tcccagtggtc tctgtaagag gcctgtgtgc 94440
 ttgggaaggt gaagagccag aaatggccat ttggagacta aattttcagc atgtgtcccc 94500
 attagggata tactgtggaa ctaaacagc ccacatcagt gtgtctctcc cagtcacaaa 94560
 tcgaatggac gtgccacttt caggctaccc aagcccgatt aatgcacagt gacagctgaa 94620
 tttactgtct tttactgca gctcagcacc aaggcctgag tagaaataat ctttttatct 94680
 cccaataaag gagaattacc agcatttcgt agctcagctc tctctgaagg gccatcttta 94740
 gaagctagag gctttgcatt tcctggaatg gtcagattaa agatgctttt cactgatctc 94800
 tgggcaggta gatgattata ctgtcaccca gttgcctgt gggaagcact gcgggtttcc 94860
 attttaaagg gatttcagag cacaatgtc attctcgaaa acttttctga aagaccaact 94920

214

tagtcttcag agccatactg tttaggggcc agctgttgcc taggaacagc cagtggggac 94980
 actttgaag aatataatct ggtctgctgt cttctttact tgcagcccat gggataatc 95040
 tcaccagat cttttctgc tgtacataat tcttacacag ataacaacct tgtataatag 95100
 acaatcaaac gtaataatac cttctgttca ctttcataaa gatggctcac cttccacctg 95160
 aaatactgtt aaaactgcat tcatctcaac tgataagata tccaacatcc aagcttgggg 95220
 cttggttcct tgaatatatt attttatgtt aatcttcaaa gtaactctgt gagttagggtg 95280
 ttctacacct caatttttaa atgggagAAC tgaagccggg aacttttagc gatttgccct 95340
 agtttcaaaa gttttagtaa ttggtagaga cggaggatgc attccagtct gatcttaaag 95400
 cctgtgtcct tcccaagatc ccactctaga aatcaagggt tctcaccttt gacacctttg 95460
 gcattttgga ctggataatt ctttgttgtg gaggtgccc tgtgcattga aggatgttta 95520
 gcaacattcc tggctctctac ccactagacg ccactagcac acatgcacac acaattgtga 95580
 caattaaaaa tgtgtccagg ctttgccaaa agttccctgt aaagcaagat caccaccaat 95640
 ggagaatcac tgctctaaat gttctgaagc atttgccttc ttacaaggcg gaggttcgtg 95700
 gtcccatgaa acgcacagaa taatttgaag accctaatag tagttaggag tggccttaca 95760

gggtatgctt taagaactat gaattaatta taattagcag ttttcctttg tacttaaaaga 95820
 gcccttatc ctgttactct tgaatacat ttgtcctctg caatgagtaa atgttcacac 95880
 taaaaaaca ctcagaaact tcaatggcct gcggccgctc caggagtca gccaaagctc 95940
 ctcagaaaga cattcaagcg cccccagtt tgcttccagt tctctctccc actctccacg 96000
 catttgtagg ctacagccaa gcaatatgac tcaactgtgt taaaacgcac cctacatttt 96060
 cttgttccat gtcttggtg aggatgttca ctctctgctt cccacctctc ctattccac 96120
 gctgcacccc gcctttgtct tggaaatcct cttatgtcat ttgagttcac ttgatgtct 96180
 ctgcactccc cacacagcct cccagcaca gtggtggaag gatgggtctc tctctgtcc 96240
 acagttggtt tctatctgtc ttagtccatt ttctgtgtct ataacagaat accacagact 96300
 gggaaattta tttttaaaaa aagagattta tttggcttat ggttctagag gctgggaaat 96360
 ccaagagcag ggcacttgca actggcaaag gtcaccccat ggcagaaaac agagggcgaa 96420
 agcgagcaca caagacagag agaagctcaa gccaaactcg tccattccat cagaagccca 96480
 ctccacaat aacacaataa tagcaataat ccattcataa gggccaagcc ctggtggcct 96540
 aatcacctct caaaggctcc acctcccaat actgttcaaa tgacaattaa atttacacat 96600
 gagtttctgc agggacattc aaaccatagc agcatctcgc tcatctcaac cagttttatg 96660

gagagtgtgt gatctttcat gctggattga aaattcttag agaacaagta ctatatttca 96720
 gcccttctag tcagccctta tctcttagca gatgtgtat acttgtgggg ttggactaga 96780
 tcagattgga ggtgggattg aatgaatatt gcaaaggtaa acatctgact ggtttccatg 96840
 ggcattaaaa taaatttcaa acgtgagagc tgggcagtgc agtgaagaca atggagcaca 96900
 gcagtttgc tttctagtgc acagctgccc tactccatgt gacttcgacg cactgagtgg 96960
 gcctctgacc agggccacca ctagggttgt gccatttag cccactggg tggctcctgg 97020
 ctgagagtgt tgtggggctg gcattctctt catatttccc tcaactgaatg tgtgtctag 97080

215

216

gcaggcctgt gcttatcaga gcaagggccc cttttccaaa acttcacaaa ggtggcatat 97140
 gggctgggtg aagccctgac agtagaaact cttccatgag gaaagggaca ccacatctga 97200
 catttttate cccaaattta taggtaatca ctactttaac taagacctat tgcactggat 97260
 cctgcctagc ctaatcttat ctctttgttt taccactgct cgactaatga gacgtgggta 97320
 ttgattcatt caacatattt gtgttagtca ttgaatatgt gtttaggcta caggagtgcg 97380
 aaaaaaaaag cccctgtcct catcaatcta gtagattctt atatttacc ctcagtgttc 97440
 accatcagac aacagtctac atgaaaaaaa tgtatatcca agctcctatt ttggagagtt 97500

ctgatacccc tggcttgagc ttttcttgag agcgtttttt tgtttttgtt tttttgtttt 97560
 ttttttgatg aatgtatttg tctggggcaa ccattttaga aagtaacttt gcctagggtg 97620
 ctaaaagtgc cacatgggtg tctcagcata gccagggcct agagagtagc actcctcagg 97680
 gaagccctca gctcctgcat ggtcacatag tctaatttca gctgcagctg ttcaggccat 97740
 ctgaccaagt ctcttgagag agtctgagca ttccatacca ttttcatata atattaaggt 97800
 gtaaactgag cattctccag aaaccagccc agaaccaact ttaactaaa aatttccaag 97860
 gaaggccatc tgggcataaa tgcacaggat ataagtgaag actggagtct aacctttaat 97920
 gttcctattg gctgaaacag aaactgtcac atcttgaaca cttcatctta ctattccctt 97980
 cttgtatcta cagatgggaa actgtgcagc agctataacc gaggactcat ctcaaaggca 98040
 aaaatcaagg ctatcaagta tagcatcctc atcattcttg gtaagcaatg tccctccttg 98100
 agctgtaaag tggatgaac gtcccaaaag caagtttctt cctgggacct ggtgacagaa 98160
 aggaatttgc cagcaggcac ttctacatcg gtctgcttag aaaggaatgt gtgaaactca 98220
 tcagcccatc catggttctt tcaagggtg acatttgggt cctaaccctt ctccttatga 98280
 atacagctgc ctgccaaggc tatgggttga ataatttga gaaaatctga ttaggacctt 98340
 actagctgaa gtggatgctc acatcaccag ctaactcagt cacttccttt aagacacact 98400

gttccccagg gctgggggtc acaaggaaaa agaagataga agtgactttc caccttatct 98460
 gaatatttga tgttaggttc actacaaatt tcccccttat ggcaccttac ctgtccttcc 98520
 accctcctgt cttctgcctt ttcttttcc tttctctcta ctcttaagac tcataaagtc 98580
 acctgtact attcctgtc tgaatgctc tgcctccgg tgggtccccg gcttacttcc 98640
 taatctcatt tgttcccaa caacgccacc tccctgaggg ctcttgata agtctttta 98700
 aatatccttt ttctagtctt tactctgcct tatttttctt cttggttcta cctcacacta 98760
 caggatatag attgattttc ttatagtctg tctccctgt tggagtaata aatctatgag 98820
 ggcaatgact ttggcttttg tgttacttat attatcacca agacctaaa tagggtctcc 98880
 tacacactgc tcaattaaca ttgtcgaat gaatgaatga atgaatgaat gaaactatgc 98940
 aagaaggaaa gggatttgtg ctattttctt ttttatttag cttaaatacc cctccttgc 99000
 ccctctggca gctcttgaag ctccaaggaa gtatagatct cccttagct gcatgtcaaa 99060
 gcaccagaac agtcttctca ctttctgaa acgcaactgc aaaatgcaa acagaccaca 99120
 tgcagcatga ctcagccagc aggacgtagg cacaaaaaa cactgcagge ggaactggga 99180
 taaaacatat acaaccacc agggctcaaa aactttctga gaggttctg aagtggatca 99240

aagactcctc tgtcttctca gatagtcaga agcacagatg caccttcctt ggatgttgag 99300
 ttggaaaatg tatgtttaca agtgtgtccc agagcctgca tagcccttta tcatcagcaa 99360
 ccatactcca aggccctgtg ggatcccttc agtcagcaag caggaacacc ctctagaggg 99420
 tcagcaata ttgacagccc taccagacca aaaggccctt ttctatagca aacactttgt 99480
 aatgtccctt tcccaccttg aaataaaatg cctacttata ctacctacca tgatcattta 99540
 aacattaata tattgccc aaataaatat aaaaggaggaa taagaaaata atctaaaatg 99600
 aaacaatact atttttatta attaaaatgt ataccaattt taatgtgtaa aaacataagc 99660
 acagctacac tagaagaata atgaagtagt cacacctaca ccgtgacata ataacagcca 99720
 caatgaaaac caatacaggt gtattttcat ggagacataa aaaaatgtaa gcggtattac 99780
 tgtcagtgc ttgattttct cagccggcaa aaagaaaaa tccttgtaaa attttgaatt 99840
 aaacaaagta atcttctcct catttacaac agaattgcat ttctacaaat ttcaatattt 99900

217

218

atttaaaata cctgtgttta tgtgtaaaac aaagtcaggg ataactatat agagggttct 99960
 cctctacatg aatggacatt caaagtagat acaaatcttt gctggctggg ctgcgtgtac 100020
 catgccagag gactggtatc cctgtgaaaa cttgaatcct ccaacccaac ttacacacac 100080
 atggaaacac ccaagcacac aaggccattt gcccccttag tgccecaaat actgttcagc 100140

gccagtgttt gggttaatta atcaggatcc agaacactta gtgggttttg tgtttgaatt 100200
 gctcctcttt aatacattgc caaggtctgg ggtcgagagg ggaacatga gtcagtttat 100260
 cattccaaaa ttcccaacaa gttacagaat ccacattaca cagttatgac ggaaagcttg 100320
 tccttgcacg cagacagcca aggaagccaa acttctactc cgagaaaaaa ttctatggat 100380
 gaaaaagtgg gagaaggaga gtggagaatt tatggtgaga aaatgagaga tgcgtgtatt 100440
 tccagtcaac ttaggagtgt ttagctctgt gtcgtagtct gtgctttcca gaggaaaatg 100500
 agagagagag agagagaggt ttattagaag gaattggctc aggtgattac tgaggctgag 100560
 aattcccaag ctgcagtggg aagctggaga cccaggaaaag ccaatggtgt aggttctagt 100620
 ccaagtctga gtccaaaggg ctgaaaacca ggagaatgga tggggtacat ttcagtttga 100680
 ttccaagtgt gaaggcagga gaagaccaac gtcctagctc gaagacaggg aagcagagtg 100740
 aatcttctct tacttaacct ttttctatga ctcaggcctt caacagattg gatgcggccc 100800
 acaaacaggg gagggcaatc tgcttttctt actctaccag atcaaatgtt actctcctcc 100860
 agaaacgtct tcatacacag ccagaatagc gtttaaccga atatctgagc actccgcagc 100920
 ccagtcaagt agtctcaaaa ttaaccatca cacctgaatc cccaccttc atccatttct 100980

tttgagaatt tggggccaaa taaactgggtg tctcacacat actaatggat ttagagaagg 101040
 gcatagtgtg ggtgttttct ggagaggcca acttaggggt gaaagagaac actgtcatta 101100
 aactgggggt tgcttagaaa atattgtgat cacccttctt cctgacata acctaaaacc 101160
 agtagtcaat acgtggtcaa aatgcttctt gttcttctgt ctttctctag agagtcttca 101220
 aagtattttg ctgttttttc ctgacccctg tgtttgatga gagctatgg ccatagtcac 101280
 ttgttctctg ggtttctata aagaatccac agcagtagaa atttgacct tctttacaga 101340
 tagagaagct ctacaacctt tgctcagttt taggaacatg tctgtaagat gtgtccatat 101400
 atatgtgtgt atgtgtttta gtgaatatga catcaatgct ccaacaaca tcaaaactcca 101460
 atatttctga gaaattccag gtcccaaaaga acctctcagg taaaagtcca gtcaggacca 101520
 accaaaagag acccctcaac tgctacctgc tgtgatgcta atggtctctt tctccccag 101580
 ccttcatctg ctgttggagt ccatacttcc tgtttgacat tttggacaat tcaacctcc 101640
 ttccagacac ccaggagcgt ttctatgcct ctgtgatcat tcagaacctg ccagcattga 101700
 atagtccat caacccctc atctactgtg tcttcagcag ctccatctct tccccctga 101760
 ggtaagggga gctcttgcac gggtcagaca cactgatggc cattgcactg ggattctgcc 101820
 aacatgtggg tttctcatgt ccaaaactct cagcaggtta caggatcccc cttttataga 101880

tgagaggctt gagagtcaga aagattccac taacatggct gattcaaacc ctggcccagg 101940
 ccacagctga tgtgtttttt cctataccac aacacctctt atagaaaccg ccttaatcat 102000
 gacacatcta gaagaccttg cttttattca aagcatcttc acatgaattg cctcaatata 102060
 attctatgac aataatagga catggagcct tattaccatt ttacagataa acaaagtaaa 102120
 tcttacatgg ttaatagcat cattgagttt atatgaataa ttagcagagc tgaattataa 102180
 tccctccac agttattgtc attcttctgt tttctgctg ttttctagct gtttctctgc 102240
 ataagccaca gagggtaggt ggagaattcc ataggagata caagaggaga atgatttaag 102300
 tcttgggctt aatgccagtg gttgaagttt atatcttgc attgtttatt cgtagcagat 102360
 tgtgaccttg ggcaagttat ttaacatctg taaacctcag cttcttcac tgtaaacag 102420
 ggctaatagc agtgtctacc tgttgccctg tgatgtctct gtcctctggg ctctgggtgt 102480
 gaccagttag aaggagagct gtgagtcacg gagaaggag gtcagggtat tacatgtaaa 102540
 gtgcctggca cagttgtctg acatttaata catttttcat aactattgtc tcttaacatg 102600
 tctacttgcc ttttcattag gtcaaatat tccctccct gctttatttt gactttctcc 102660
 agggagcaaa gatcacagga ttccagaatg acgttccggg agagaactga gaggcagtag 102720

atgcagattc tgtccaagcc agaattcatc tagaccctag ggcagtgcc gtgctaggct 102780
 gagcaccatc agctctccca ggtccttgct acctgcttgg gcacgtgcat ggaacccgag 102840
 ccaacttcac cccaccctcg tcattacctg ggagatgcac aagacaaatg ttctaattgac 102900
 tgcattgact gcttaagtat tggccaacac gaactcccca gttattcatg ccagccagga 102960
 aggaaagcc ttcttccccc accattccca gccctccttc ccaactggcca gcacctgaac 103020
 ccagtgaaca caggcattag tggccaggg tcctggcttg gagccagtga gtagacaggg 103080
 aagcagaggg gacaaaggta gctgggttat acatgaatat tctcattaca atagaagaaa 103140
 ataaaagact taattaagcc catatttttc cccagtttt ggattggagg ttcagtgtct 103200
 gtagccaaga aagtgtttgt ccttgaatg ccaacaaatt cattccagg cattgtgtct 103260
 ttgcacctct tctgcagata gcctcggttt gcagatgggt gtgtggcag cagccaagt 103320
 catctctat tccatcaaca aatgatttgt ggaaaggcca tgctgttggc cctccaaaac 103380
 aaggtgaaat gaagggatc tggttctgat agaaaacaag ttgtgttaa aagccatggg 103440
 cccctgactt ccagcctctg agagctggc cctagaacac acatgtcctt gagcctttt 103500
 ttttttttt tttttttga cagagtctcg ctctgtcgcc caggctggag tgcagtggca 103560
 cgatctcgcc tcaactgcgag ctccacctcc cgggttcagt ccattctcct gcctcagcct 103620

cccagtagc tgcgaccaca ggtgcccgc accacgcctg gctaattttt tgtattttta 103680
 gtagagacgg agtttcaccg tgttagccag gatggtctca atctcctgac ctctgtatct 103740
 gcctgccttg gcctcccaaa gtgctgggat tacaggcatg agccaccgag cccggcctgt 103800
 ccttgaggct ttctgagacc tctcactctg tatttaacac ttgggccact ctgggctcca 103860
 ttcttcacac ctcaaggaca agtcttcccg tttttaaatc cctgaacact ctctttagtt 103920
 aggagctagg ttctgcggc ttttcaggc ttaatgttc tctaagatct ttatcgtttt 103980
 tgcctgtcac agcctttgtc tagcacctcg gccaggaagt gctgggtggg cttattttga 104040
 cagatctgga gtttggtagt tatgagcata atccaagtga aatatgacta aatgttttct 104100
 agtcaatttc tctatcaga tttttccaca agtgggaagt aaataatttc atttgatcat 104160
 atatacatcc caccacggc tccggtatgc acgtgaacac cttatttttag cttcacgtat 104220
 attcttgaca ttaaaatctc cttggcaaaa tctccttcc cagaattatt cagagcttaa 104280
 atctttttt ttttttttg catactgcta gtggagtcat taaattgttc agtatatttt 104340
 aatagcactc cattcctcat tatggtgtca actcaaagtc tgcgtgttta aggtcatgtg 104400
 ggctttttt tttttttca taaactctt tcaattcgat ctgaccttag ggaaagtatc 104460

tctttaggag gaaatcagac tctcactca ccattctctg gagaattatt ctctgaattt 104520
 gaggagcctg aataatctag tttattttct acacaacagt ttggaaggct gcctccctct 104580
 ctgtccaate agctaaactt gagcaacctt ggaagctttg agcatttgag aaatgctttt 104640
 caacatttca ctttaaatca agatgtgcc cagaagacc acggaactgt tgctaaaata 104700
 gctggctgca taggagccaa ttaacagagc aaaatctggc agatgtccta catggcaaaa 104760
 caggaggacc aggttctctt gacagatgct ttaattctt gtcaagtctg gtctgcaaaa 104820
 tacattacat gcctacctca tccatcagta gagtctcaaa gtgaaggaga gagtggagt 104880
 aggggcgttg tgatctgtag aaactgtgaa catgattttt tagttgtgat gctgtctctc 104940
 tcatttcccg agaagactgg agatcaataa gataatggta cagggtgtct caggataatc 105000
 taccatttaa atgaaacttg ctttatattg gtaaggattc tggaattgtc atttccatgt 105060
 atttctgag cttggagaaa catgatttaa gcattatgaa aatactggta attggccggg 105120
 cacagtggct cacacctgta atcccagcac ttggggaggc tgagggtggc ggatcgtgag 105180
 gccaggagat cgagaccatt ctggctaaca cacggtgaaa cctgtctct actaaaaata 105240
 caaaaagatt agccaggcat ggtggctggc gcctgtagtc ccagctactc aggaggctga 105300
 ggcaagagaa tggcatgaac ctgggaggcg gagcttgag tgagccgaga tcacgtcact 105360

gcactgcggc ctgggcgaga gagcgagaat ccgtctcaag gaaagagaga aagagagaaa 105420
 gagagagaga gaggaaggga ggaaggagg aggaaggaa agaagaactg gtaattaata 105480

221

gtcttgtgac cttgaacaaa tcatttcaca cctctgggca ttgatggtct catctgcaag 105540
 atggggacaa aatcaggctg gagcagagga tcttgggtgt tcctcccaga cacagggagg 105600
 aatctctgag attgtgtcca gagactgaga gcttctggaa ttctttcccc aggggaccaa 105660
 tgactcagtg acttaatgct gagtcatttg ccttttagag gtgtgacttc cctatctatc 105720
 actatgaatg cagagaaata tcatttccca actgagaaat gcagtttgag ctcttggaga 105780
 aaattagaag cttagtgtg tgacgttact gttgttagcc ttgatgccc atgtggaatc 105840
 agagaagcca gcaggacgat acctaaaata aagggtctta ctctctgcac caagatgtca 105900
 aaaagtctac ggttacatta ttgcatggca tcagggacag gagaaaattt aggagagcca 105960
 gagtaggtgt gcttactata ttcagccata ctatagaaaa taagtgactc tactttactg 106020
 aactaaatta aatatgaatg gtaaaaactt ctctacttgc aggggtgcatg tggaacataa 106080
 tttagttaga gtttactttc actaagcaac atctcccacc ttttccccca gaaaatgata 106140
 acaccttttt aatgactttc atttgtggat aatcatgaga aaaaagtggc ccttttaaat 106200

222

cagcccaaca cgcagcttaa acttcctagc ttcatttggga aaattctgta tactcatata 106260
 cagaaatgac cttgcctctt ccaactgcat tcacagtgtc aatcagaaaa ggccacaagc 106320
 ctgagtctga gagaaaaaag gaaaacaaaa atatcttttag caggaaataa agtgattctg 106380
 ctcttctaga attatcttag gtgagctaca gacctgctgg caactccaat tttctcgtca 106440
 tcatttgaat gtacctcacc ttatatgcag atcgactagt gtcccctgaa gctttccaat 106500
 tgcatttaat tgaagggaga aggccgtaac tgtttagggtg ccaatctctg tgtttttgga 106560
 aacatgaaaa acccatgect catttctctg caattgcatt ttaagaatac attatccgca 106620
 acaggctggt tcagttaaca ttttaaaagt gcaattccag gcttacagaa tgtaaagtg 106680
 gatggagtct tatatcagct ggtctcatgg ttttcagatt gctcggagac tccaaaagctg 106740
 ttccaaggag gtgactcaat attaatattt ttacacggcc gggcatgggtg gctcacgcct 106800
 gtaatcccag cactttggga ggccgaggag ggccgacac ctgagttcga acaggagtgc 106860
 gagaccatcc cagtcaatat ggtgaaaacc cgtctgtact aaaaatacaa aaattagccg 106920
 ggtatggttg cgggcgcgct gtaatctcag ctacttggga ggctgaggca ggagaatcac 106980
 ttaaacctgg gaggaggagg ttgcagttag ccgagatcgc accattgcac tctggccttg 107040
 gcaacaagaa ggaaactctg cctggaaaaa aaaaaacaa aaaacaaaaa aaacattatt 107100

acgcacaaca atagcataga aatcgagagg caattaaatg tagttagttt caagttcctt 107160
 gaattatctt gcatgcaaaa tgtggattat tagtcattga tacaccaaga atgcatgtta 107220
 caatttcagg gtcatacta aaatagtaga aatgcaaaaa catacatctt tcagagtaaa 107280
 agagaaggaa agctgagtga taagtactc aaacaatttg aaagaaagca agaaaagaga 107340
 gaaacaggga cataaaacag ctgggataaa cagaaaaacac ataggaagat ggtgggtttt 107400
 ttatccaaac ttactagtaa ttataagtgc aaagagatta aatgccccag ttaataatca 107460
 aagactatca gactgatttt ttaaaaaata aataactgtc tgctgtttac aaaagacatg 107520
 cctaaaacac aaggatacag aaagtttgaa aatcaaagaa tggatcaagg tagtccatgg 107580
 aaactgtage taaaagaaag ctggtaaggc tatattaata agactaaat accttttaag 107640
 gcaaaaagta ttagtagagt taaacaggga cacttcgtaa tgataaagat tttagtttaa 107700
 taagatgaag taataattct aaatttccag gcatttaaaa acatggcctc aaaatatata 107760
 cttttaaaag ttgtcagaac tatgaaacaa atagaaaaat tcacaaccct aatggggaat 107820
 tttatcacac ttaatgccag tcattaaagc agacaaaaat caggaatgat ctggataatt 107880
 tgagcaacat gaataacaca ggaagagcac tttaccttac caccctgaa cagacatttt 107940

tttaagcac acatgaagca gttaccaaag ttgaccacat gctaggccat aaaacaaget 108000
 tcaacacttc cagcagattg aattcatata gtctagtttt tctgatcatg ttataattat 108060
 gctggaactc aagagtaaga ggataactag aaaattcaaa taggtttgga agttaggaaa 108120
 tacacttccg aacaacttat tgccaaagaa gaaagcatat gaaaattaga aaacaattgt 108180
 actgaatggt aatgaaagta ttatgtatta aatgtatagg atacaaataa aacaatactt 108240
 aaagaaaaaa gagaaggatt aaaaatcaat aaacaaatta tctatcttat gaagttagaa 108300

223

224

acatttacca aattaaactc aagggaagta gaaagaataa aataataaga ataggagtaa 108360
 aattaatgaa ataagaaaca aacataataa aaagcctcaa caaagatcaa attctgttct 108420
 tgaaaaaaat taaattaata aacctctggt gagactgatc aaaggaagaa aaagagagaa 108480
 ggcacaaata aacagtattc tttaaatgat atcactatag atcctagagt caatcaaaag 108540
 ataataaaag gatattatga tcaagcttat gtcaaaacaa attgaaaata tagatgaatg 108600
 ggaaaacata taattgaccc aagaagaaac aaaatcagaa tagtagcata actgctaaag 108660
 aaagagaatg tcttcattgg tgagctgtac taaaatttaa ggacaaagca acaccaatgt 108720
 tatagtcttc agtaaaatag aaaaagtgtg acttttcaga ttatttatga ggctaaaaaa 108780
 acctcaatat caaatgctac aaaggcatta caagaaaaaa attgcaagtc aattttgccg 108840

cagaaataca tgcaaaaatt ccaaaaaaaaa attaccaatc aagtcagca aaatataaca 108900
 aggctaocat atgtgacaaa actggtttca ttccaggat gcaatgttgg ctactatta 108960
 gaaaatcact caactcgtta cattaataga ttacaggata aaacaatata taaactcaac 109020
 agatgcagaa aaaaatgttt gataaaaatt tttgagctcc aattataaga tattcacaaa 109080
 cttgggtag aagacaatgt cttaaacctt aaagtttctc tgcaagaaag ctacaggaaa 109140
 cctatactta atggtaagc tttgaagatg ttcttttga aataaagaat gagtgaagaa 109200
 tgccagcatc aacacttctg ttcaacattg taagaaatcc tagtcaatgt agtaaaacaa 109260
 gaaaaaaaa taagataaaa ggtatatgga ttcataataa ataataaaaa ctgacaatat 109320
 agatataaat atatagctga atatccaaaa taatatacag ataaattatt agaattaatc 109380
 acaagggtta ataagggtgc aggatacaaa aatcaatatt attccacat agcagcaata 109440
 aataaaaaat ttaattttta aagttttgta gcaatgaagg gaaagcttcc tttttgccct 109500
 tggaggcttc actgaaaaat caagtcataa aaaggcagaa aaataagaga aaaagcataa 109560
 aatttattac tctatgcac acggggaaaaa tcggagtgtg tggccaatac ttcaatgggt 109620
 acagatgctt gtagagcctt cttcttaggg gaaagagaga tggggaagcg tggatgattt 109680

taggggaata ataaatgatt tttaggaatt tgggtgtgctt gaagaaaaca atgggtccagg 109740
 acagagtctg ttggactcac agagcagact tttgtttgtg acaaaagtct gtccaggttt 109800
 gttgatagac tttagtcttc cttcttgtga tatgggttca gttaatgaaa actcggggaa 109860
 gggaccgcaa gtcattgttt tcttctttgg taagtctaga attaggcaga taaggaaact 109920
 tcatgattga gaggcaggag gagggagagg agaaacaatt gttctccctg gtaagagaac 109980
 tgaaaactgg tccagtcttt atgtagatgg ggggggaaat ctcttctagc atctgctgat 110040
 ctctaagggc cttttaatc aaaatatatt ataatgcat gaagccatat tttagggtta 110100
 agttccatga gctcctgat tctgtattta caatagcctt aaaaaatgaa attcgttaga 110160
 gtaaatattt aaaaaggtat gtaaatctct atggagaaat tataatacta ttgagatata 110220
 ttctaaaaac taatgaaatg cagaaatata tcatgactat tgttcagaaa ctgaatatcc 110280
 taagataatc aattttcaa ttgatctctg aagattcagt agaagccaa gaggaatttg 110340
 gtagaacttg gtaagttgtc tctaaaattt atatggaat gcaaagggcc aaaaatagcc 110400
 acgacactgt tgactaaaaa ggaaaaaaat gggagagcct aactaaccac atatcaaaact 110460
 tatcatgaaa gaataataat gaaagctgtg gtatgggcgc taaagtagac aacttagcaa 110520
 atggaataga aaaggagtcc agggaaagat gccacatat aggtaaacga tttgtttcag 110580

tggttaacatt gcaaagcagt aaggaaaggg tgttcttttc aattatataa aaaattggac 110640
 atttatgttg gaaaaaattt actgaaaacc tactggatta tatgtcaaat tggttccagg 110700
 tggattatag acctaaatc acaagacaat aggacgtga aaaaataatg tgacaaaaca 110760
 caaaacactg tactcatgaa gaaaaatatt gatacattta attatttaa agtagaaatt 110820
 tctgttcac aaaaatatatt aaaaatgtga aaagacaagc tatagaatgg aaaatgacat 110880
 ttgcaaaaata tataactgac caagatctag tatttgaat atataaaaa tactgcaaat 110940
 cagtaagaaa aagattttta aagacagtag aagacataga aaaatgggca agaattaact 111000
 tcagaaaaga agttatccaa atggacaaaa aactatgaaa aggtgtttta tctcattaaa 111060
 aagcaaggga aagtaatta aatcacatg atatatgagt atgcatattg gcctaactta 111120

225

226

aaacctttga caatatcaaa tgttgctgag gatgtacagc atcagaaatg cttatcttgt 111180
 gtgaactgga gaataattag tacaactatt ctggaaaatt atgtgcctta aactagtaaa 111240
 actaaggatt tgtgtttccc gtgaccttga aattccacac tgagtacaca ccctacagaa 111300
 gtgtgaatta tgtgcacat aatagatatg aaaaatattt gtaatagcac taattataag 111360
 agcctcaaat tggaggcaaa acaaatgctt attagcagta gaatagataa ataaattatg 111420

gtgtatttca tacaatgga tactttacag caacaaaaaa atgaagaaac tgcataatgct 111480
 tgcagcaaca taaaaaaact ttaaaaacat aatataaagg tcaaagacag agacattaaa 111540
 gataacatat gatctcattt atatgaaatt caaaactaac caaaattaaa ttatcatatt 111600
 tagcaatgca cacataggta attgtattag tccgttttcc aactgctga taaagacata 111660
 cctgagactg gacaatttac aaaagaaaga ggtttatttg acttacagtt ccacattgct 111720
 ggggagggtt cacaatcatg gcagaaggca aggaggagca agtcacatct tacatggatg 111780
 gcagcagtc aagagcaagc ttatgcaaag aaactcccat ttttaaacc atcagatctc 111840
 gtaagacca ttcactatca caagaacagc acaggaaaga cctgtcccca tgattcagtc 111900
 atctcccact gggtcccttc cacaacatgt gggaattatg ggagctacag gatgagatct 111960
 ggggggggga cacagatcca aaccatatca gtgacaaaac tctaaagcaa agcaggaaat 112020
 cactttttat aagagtccag attgaaatat ctttgtgggg agagggagga gatgtacaga 112080
 gagaggctgg cagagtctct tttttgctct aggtggcagg ttcaagggtg ttcagtttat 112140
 tttggaagca gtgcagagaa gggagccaga ctagaaacag ggaggatgac 112190

<210> 17

<211> 23

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: synthetic DNA

<400> 17

cgtgaagtct ccagtgaatc gcc

23

<210> 18

<211> 22

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: synthetic DNA

<400> 18

gatggtgctc agcctagcac tg

22

<210> 19

<211> 880

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 19

agcacgtaga tcttcctgt catcaggcag agctcttcag ttaggtgggc tcaggagggg 60

ctctgtgcct ccgttcagca gagctgcagc tgctgccag ctctcaggag gcaagctgga 120

ctccctcact cggctgcagg agcaaggaca gtgaggtcca accccgctg agcc atg 177

Met

1

227	cca gcc aac ttc aca gag ggc agc ttc gat tcc agt ggg acc ggg cag	228	225
	Pro Ala. Asn Phe Thr Glu Gly Ser Phe Asp Ser Ser Gly Thr Gly Gln		
	5 10 15		
	acg ctg gat tct tcc cca gtg gct tgc act gaa aca gtg act ttt act		273
	Thr Leu Asp Ser Ser Pro Val Ala Cys Thr Glu Thr Val Thr Phe Thr		
	20 25 30		
	gaa gtg gtg gaa gga aag gaa tgg ggt tcc ttc tac tac tcc ttt aag		321
	Glu Val Val Glu Gly Lys Glu Trp Gly Ser Phe Tyr Tyr Ser Phe Lys		
	35 40 45		
	act gag caa ttg ata act ctg tgg gtc ctc ttt gtt ttt acc att gtt		369
	Thr Glu Gln Leu Ile Thr Leu Trp Val Leu Phe Val Phe Thr Ile Val		
	50 55 60 65		
	gga aac tcc gtt gtg ctt ttt tcc aca tgg agg aga aag aag aag tca		417
	Gly Asn Ser Val Val Leu Phe Ser Thr Trp Arg Arg Lys Lys Lys Ser		
	70 75 80		
	aga atg acc ttc ttt gtg act cag ctg gcc atc aca gat tct ttc aca		465
	Arg Met Thr Phe Phe Val Thr Gln Leu Ala Ile Thr Asp Ser Phe Thr		
	85 90 95		
	gga ctg gtc aac atc ttg aca gat att att tgg cga ttc act gga gac		513
	Gly Leu Val Asn Ile Leu Thr Asp Ile Ile Trp Arg Phe Thr Gly Asp		
	100 105 110		
	ttc acg gca cct gac ctg gtt tgc cga gtg gtc cgc tat ttg cag gtc		561
	Phe Thr Ala Pro Asp Leu Val Cys Arg Val Val Arg Tyr Leu Gln Val		
	115 120 125		
	atg gta atg aag tta ttc cat att cag aaa atg aat atg gaa tagttacaat		613
	Met Val Met Lys Leu Phe His Ile Gln Lys Met Asn Met Glu		
	130 135 140		
	cttcttttgt gctctgaata taaccttgaa agtttggtat gtctgaaaga gccttttcta		673
	ttatgtacgg ctagtatttt ctcaggggaa atttttaaaa acatatttca atttcttct		733
	gaggatattt gcttccttgt aaataaatgc tttcaattgc ttattatatt agcaatcaat		793
	tgctgataca caaattatga caaacaatgg tgcttaaaaa caataaacat ttattatctc		853
	acaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaa		880

【図面の簡単な説明】

【図1】 KAT06734Lポリペプチドのハイドロパシープロットを示す図である。このプロットは解析ソフト (MacMolly) を用いて作成した。予想される7つの膜貫通領域 (TM1~TM7) を図中に示す。

【図2】 KAT06734Lポリペプチドと既知GPCRのアミノ酸配列をアラインメントした図である。既知GPCRとしては、ヒトバソプレッシン1A受容体 (V1aR)、マウスバソプレッシン1A受容体 (V1aR-MOUSE)、ヒトバソプレッシン1B受容体 (V1bR)、ヒトバソプレッシン2受容体 (V2R)、ヒトオキシトシン受容体 (OXTR)、ヒト黄体形成ホルモン放出ホルモン受容体 (GnRHR)、ホワイッサーのバソトシン受容体 (vasototin) を用いた。アラインメントは、CLUSTAL X Multiple Sequence Alignment Program (<ftp://ftp-igbmc.u>

[-strasbg.fr/pub/ClustalX/](http://strasbg.fr/pub/ClustalX/)) を用いて作成した。KAT06734Lポリペプチド中の予想される7つの膜貫通領域 (TM1~TM7) を下線で示した。全てのGPCRで保存されたアミノ酸を*で、よく保存されたアミノ酸を:または・で示した。

【図3】 図2と同様な図であり、図2の続葉である。

【図4】 図2と同様な図であり、図3の続葉である。

【図5】 図2と同様な図であり、図4の続葉である。

【図6】 図2と同様な図であり、図5の続葉である。

【図7】 KAT0673L cDNAの塩基配列と該cDNAのコードするポリペプチドのアミノ酸配列を示した図である。実施例で使用したプライマーの位置とイントロンの位置を合せて示してある。

【図8】 図7と同様な図であり、図7の続葉である。

【図9】 図7と同様な図であり、図8の続葉である。

【図10】 図7と同様な図であり、図9の続葉であ

る。

【図11】 KAT0673-3'の塩基配列と該配列から予想されるアミノ酸配列を示した図である。図8で示したイントロン3の位置を図中に示してある。

【図12】 図11と同様の図であり、図11の続葉である。

【図13】 図11と同様の図であり、図12の続葉である。

【図14】 KAT06734Lポリペプチドと既知GPCRのアミノ酸配列を用いて作成したデンドログラムを示した図である。既知GPCRとしては、ヒトバソプレッシン1A受容体、マウスバソプレッシン1A受容体、ヒトバソプレッシン1B受容体、ヒトバソプレッシン2受容体、ヒトオキシトシン受容体、ヒト黄体形成ホルモン放出ホルモン受容体、ホワイットサッカーのバソトシン受容体を用いた。デンドログラムは、CLUSTAL X Multiple Sequence Alignment Program (<ftp://ftp-igbm.c.u-strasbg.fr/pub/ClustalX/>) を用いて作成した。

【図15】 PCR法を用いて、35種のヒト臓器におけるKAT06734L転写産物の発現量を調べた結果を示した電気泳動の図である。PCRのサイクル数は35である。矢印は目的の増幅断片(318bp)の位置を示している。電気泳動図の各レーンのサンプルは以下の通りである。

n.c.: ネガティブコントロール、1: Adrenal Grand (副腎)、2: Brain (脳)、3: Brain, caudate nucleus (脳、尾状核)、4: Brain, hippocampus (脳、海馬)、5: Brain, substantia nigra (脳、黒質)、6: Brain, thalamus (脳、視床)、7: Kidney (腎臓)、8: Pancreas (膵臓)、9: Pituitary gland (脳下垂体)、10: Small intestine (小腸)、11: Bone marrow (骨髄)、12: Brain, amygdala (脳、扁桃体)、13: Brain, cerebellum (脳、小脳)、14: Brain, corpus callosum (脳、脳梁)、15: Fetal brain (胎児脳)、16: Fetal kidney (胎児腎臓)、17: Fetal liver (胎児肝臓)、18: Fetal lung (胎児肺)、19: Heart (心臓)、20: Liver (肝臓)、21: Lung

(肺)、22: Lymph node (リンパ節)、23: Mammary gland (乳腺)、24: Placenta (胎盤)、25: Prostate (前立腺)、26: Salivary gland (唾液腺)、27: Skeletal muscle (骨格筋)、28: Spinal cord (脊髄)、29: Spleen (脾臓)、30: Stomach (胃)、31: Testis (精巣)、32: Thymus (胸腺)、33: Thyroid (甲状腺)、34: Trachea (気管)、35: Uterus (子宮)、36: Standard 0.01 fg (標準試料 0.01 fg)、37: Standard 0.1 fg、38: Standard 1 fg、M.: サイズマーカー

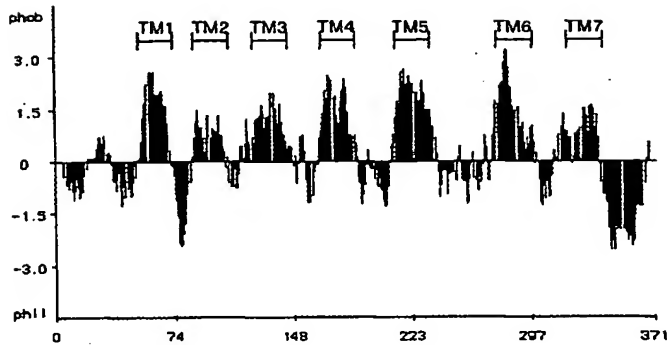
【図16】 PCR法を用いて、各種ヒト細胞株、末梢T細胞、および活性化末梢T細胞におけるKAT06734L転写産物の発現量を調べた結果を示した電気泳動の図である。PCRのサイクル数は25である。矢印は目的の増幅断片(318bp)の位置を示している。電気泳動図の各レーンのサンプルは以下の通りである。
n.c.: ネガティブコントロール、1: Jurkat、2: Molt-3、3: Molt-4、4: Hut78、5: Namalwa KJM-1、6: Daudi、7: Raji、8: HL-60、9: U937、10: THP-1、11: IVEC、12: HUVEC、13: WM266-4、14: WM115、15: SK-N-MC、16: PC-9、17: HLC-1、18: QG-90、19: PC-3、20: KATO-III、21: Capan-1、22: Capan-2、23: Colo205、24: SW116、25: LS180、26: T cell (無刺激)、27: T cell IL-2 (インターロイキン-2) + PHA (Phytohemagglutinin) + TGF- β (トランスフォーミング・グロース・ファクター- β) 2日間(2日間培養)、28: T cell IL-2+PHA+TGF- β 4日間、29: T cell IL-2+PHA+TGF- β 6日間、30: T cell IL-2+PHA+TGF- β 8日間、31: T cell IL-2+PHA 4日間、32: T cell IL-2+PHA 6日間、33: T cell IL-2+PHA 8日間、34: T cell IL-2+抗CD3抗体 2日間、35: T cell IL-2+抗CD3抗体 4日間、36: T cell IL-2+抗CD3抗体 6日間、37: T cell IL-2+抗CD3抗体 8日間、38: Standard 1 fg (標準試料 1 fg)、39: Standard 10 fg、40: Standard 50 fg、41: Standard 125 fg、M.: サイズマーカー

【図6】

VlaR	-----	
VlaR-MOUSE	-----	
vasotocin	CIPLDCSRKSSQCIPLDCSRKSSQCMSKES-----	434
OXTR	-----	
V1bR	-----	
V2R	-----	
KAT06734	-----	
GnRHR	-----	

【図1】

Hydropathy for KAT06734L



【図2】

V1aR	-----MR-LSAGPDAGP SGNSSPPWWPLATGAGNTSREAEALGEGNGPPRDV-----	45
V1aR-MOUSE	-----MS-FPRGSHDLPAGNSSPPWWPLTTEGANSSREAGLGEGGSPPGDV-----	45
vasotocin	-----MGRIANQT-----TASNDTDPFG-----	18
OXTR	-----MEGALAANWSAEAAANASAAPP-----GAEGNRTAGPPR-----	33
V1bR	-----MD-----SGPLWDANPTPRG-----TLSAPNATTPWLG-----	28
V2R	-----MLMASTTSAPVGHPSLPSLPSNSSQERPLDT-----	31
GnRHR	-----MANSASPEQNQHCS-----AINNSIPLMOGNLP-----	29
KAT06734L	-----MPANFTEGSFDSSGTGQTLDSSPVACTETVTFTEVVEGKEWGS-----	43

V1aR	RNEELAKLEIAVLAVTFVAVLGNSSVLLALHRTPRK-----TSRMHLFIRHLSLADLA	99
V1aR-MOUSE	RNEELAKLEVTVLAVIFVAVVLGNSSVLLALHRTPRK-----TSRMHLFIRHLSLADLA	99
vasotocin	RNEEVAKMEITVLSVTFFVAVIGNLSVLLAMHNTKKK-----SSRMHLFIKHLSLADLV	72
OXTR	RNEALARVEAVLCLILLALLSGNACVLLALRTTRQK-----HSRLFFFMKHLSDLV	87
V1bR	RDEELAKVEIGVLATVLVLATGGNLAVLLTLGQLGRK-----RSRMHLFVLHLALTDLA	82
V2R	RDPLLARAEALLSIVFVAVALSNGLVLAALARRGRGH-----WAPIHVFIGHLCCLADLA	87
GnRHR	TLTLGKIRVTVTFEFLLSATFNASFLLKQKWTQKKEGKKLSRMKLLKHLTLANLL	89
KAT06734L	FYYSEKTEQLITLWVLFVFTIVGNSVVFSTWRRKKK-----SRMTFFVTQLAITDSF	96

.: : * * : : : : * : :
TM1 TM2

V1aR	VAFFQVLPQMCWDITYRFGPDWLCRVVKHLQVFGMEFASAYMLVMTADRYIAVCHPLKT	159
V1aR-MOUSE	VAFFQVLPQLCWDITYRFGPDWLCRVVKHLQVGFAMFASSYMLVMTADRYIAVCHPLKT	159
vasotocin	VAFFQVLPQLCWEITFRFYGPDFLCRIKVKHLQVLGMEFASYMVMMTLDRYIAICHPLKT	132
OXTR	VAVFQVLPQLLWDITFRFYGPDLLCRLVKYLQVVGMEFASTYLLMLSLDRCLAICQPLRS	147
V1bR	VALFQVLPQLLWDITYRFQGPDLICRAVKYIQLVSMFASTYMLLAWTLDRYLAVCHPLRS	142
V2R	VALFQVLPQLAWKATDFRFGPDALCRAVKYIQLQVGMYSASYMILAWTLDHRRAICRPMIA	147
GnRHr	ETLIVMPLDGMWNITVQWYAGELLCKVLSYKLFSMYAPAFEMVVI5LDRSLAITRPLAL	149
KAT06734L	TGLVNIITDINWRETDGFTAPDLCVRVRYLQVLLYASTYVLVSLSDRYHAIIVYPMKE	156
	.. : : * * : : * : : * : : * : : : : : * : : * : *	

V1aR
V1aR-MOUSE
vasotocin
OXTR
V1bR
V2R
GnRHr
KAT06734L

LQOPARRSR-LMTAAAWLSEVLSTPQYVFVFSMIE--VNNVT--KARDCWATFIQ-PWGS 213
LQOPARRSR-LMTAASWGLSEVLSTPQYFIFSVIEFEVNNGT--KAQDCWATFIQ-PWGT 215
LQOPTQRAY-IMIGSTWLCSLLLSTPQYFIFSLSE--IQNGS--YVYDCWGHFIE-PWGI 186
LRRRTDR--LAVLATWLGCLVASAPQVHFISLRE--VADG----VFDCWAVFIQ-PWGP 197
LQOPGQSTY-LLIAPFWLLAAIFSLPQVFIISLRE--VIQGS--GVLDCAWDEGF-PWGP 196
YRHGSGAHWNRPVLVAWAFSLLLSLPQLFIFAQRN--VEGGS--GVYDCWACFAE-PWGR 202
KNSKVGQS--MVGLAWILSSVFAGPQLYIFRMTHLADSSGQTKEVFSQVTHCSFSQWWH 207
LQGEKQAR--VLIVIVIAWSLSEFISPTLLIEGKRT--LSNG----EVQCWALWPD-DSYW 207

: . * . : : * : *

TM4

VlaR	RAYVTWMTG-GIFVAPVVILGTCYGFICYNWCNVRGKTASRQSKGAEQA----	GVA---	265
VlaR-MOUSE	RAYVTWMTS-GVFVVPVILGTCYGFICYHIWRNVRGKTASRQSKGGKGS----	GEAAGP	270
vasotocin	RAYITWITV-GIFLIPVILMICYGFICHSIWKNICKTMR-----	GTRN-----TK---	232
OXTR	KAYITWITL-AVYIVPVIVLATCYGLISFKIWQNRLKTA-----	AAAG--	250
V1bR	RAYLTWTTL-AIFVLPVTMLTACYSLICHEICKNLKVKTQAWRVGGGGWRTWDRPSPSTL		255
V2R	RTYVTWIAL-MVFVAPTLGIAACQYLIFREIHASLVPGPSERP--	GGRR-----	248
GnRHR	QAFYNFFTFSCLFIIPLFIMLICNAKIIFTLTRVLHQDPHELQ-----		250
KAT06734L	TPYMTIVAF-LVYFIPLTIISIMYGIVIRTIWIKSKTYETVISN-----		250
	.. : : : : *		
	TMS		

V1aR	FQKGFLLAPCVSSVKSISRAKIRTVKMTFVIVTAYIVCWAPFFIIQMWSVWDPM---	SVW	322
V1aR-MOUSE	FHKGLLVTPCVSSVKSISRAKIRTVKMTFVIVSAYILCWTPFFIVQMWSVWDTN---	FVW	327
vasotocin	--DGMIGKVSVSSVTIIISRACLRTVKMTLVIVLAYIVCWAPFFIVQMWSVWDEN---	FSW	287
OXTR	--DGGRVALARVSSVKLISKAKIRTVKMTFIIIVLAFIVCWTPFFIVQMWSVWDAN---	AP-	305
V1bR	AATTRGLPSRVSSINTISRAKIRTVKMTFVIVLAYIACWAPFFSVQMWSVWDKN---	APD	312
V2R	---RGRRTGSPGEGAH-VSAAVAKTVRMTLVIVVVYLCWAPFFLVQLWAAWDPE---	AP-	301
GnRHR	-----LNQSKNNIPRARLTKLKMTVAFATSFVCWTPPYVVLGIWYFDPPEMLNR--		299
KAT06734L	--CSDGKLCSSYNRGLISKAKIKAIKYSIIIIILAFICCWSPYFLFDILDNFNLLP----	D	304

TM6

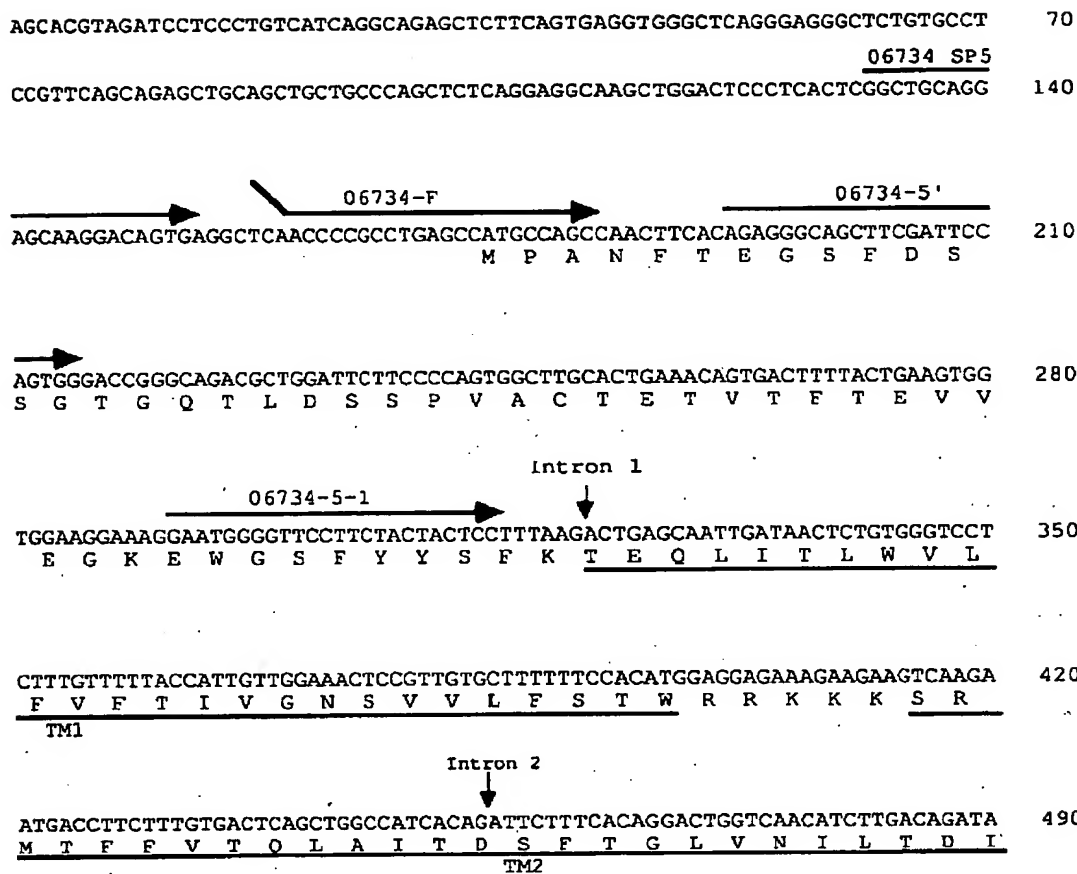
```
VlaR      TESENPTTITALLGSLNSCCNPWIYMFSSGHLLQDCVQSFPCCQNMEKFKNKEDTDS-- 380
VlaR-MOUSE TDSENPSTTTITALLASLNSCCNPWIYMFSSGHLLQDCVQSFPCCQSI AQKFAKDDSDS-- 385
vasotocin DDSENA AVTL SALLASLNSCCNPWIYMLFSGHLLYDFLR CFCCKPRNMLQKEDSDS-- 345
OXTR      --KEASAFIIVMLLASLNSCCNPWIYMLFTGH L FHELVRFLCCSASYLK G-RRLGETS- 361
VlbR      EDSTNV AFTISMLLGNLNSCCNPWIYMGFN SHLLPRPLRLHACCGGPQPRMRRRLSDGSL 372
V2R       --LEGAPFVLLMLLASLNSCTNPW IYASFSSS-VSSEL RSLLCARCRTPPSLGPQDE-- 356
GnRHR     --LSDPVNHFFFLFAFLN PCFDPLIYG YFSL----- 328
KAT06734L TQERFYASVIIQNL PALNSAINPLIYCVFSSS----- ISFPCREQRSQDSRM TFRE R-- 356
```

: : * * * *

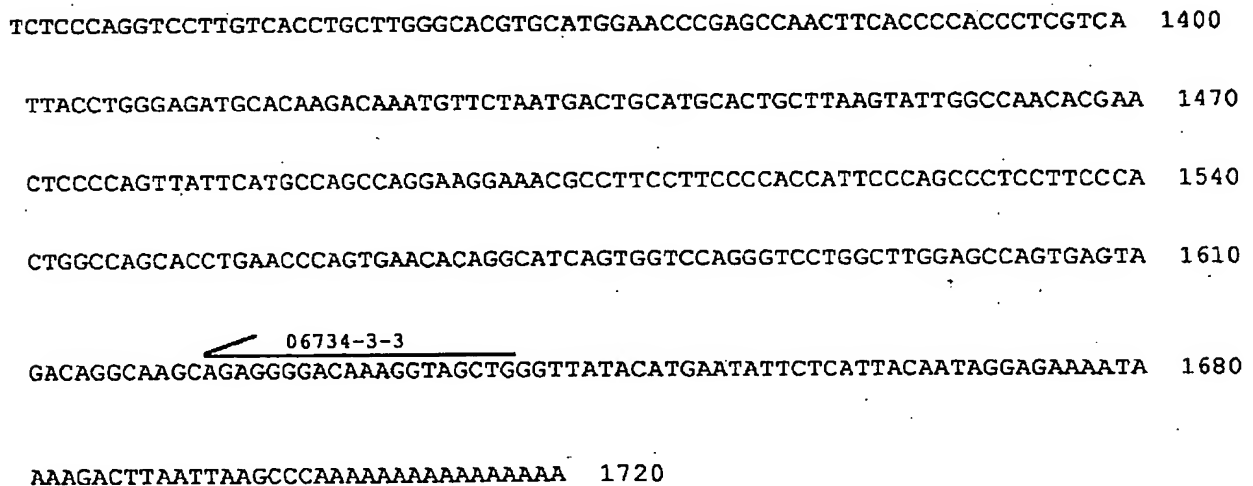
TM7

V1aR	MSRRQTFYS---NNRSPTNSTGMWKDS-PKSSKSIKFI PVST-----	418
V1aR-MOUSE	MSRRQTSYS---NNRSPTNSTGTWKDS-PKSSKSIKFI PVST-----	423
vasotocin	SIRRNLTLLTKLAAGRMNTNDGGFGSWRDP-CNSRKSSQSIGLDCFKSSQCLEHDCSRKSSQ	404
OXR	-----ASKNSNS-----FVLSHRSSSQRSC-----SQPSTA-----	389
V1bR	SSRHNTLLTRSSCPATLSLSLSLTLSGRPRPEESPRDLELADGEGTAETIIF-----	424
V2R	-----SCTTAS--S-----SLAKDTSS-----	371
GnRHR	-----	
KAT06734L	-----TERHEMQ-----ILSKPEFI-----	371

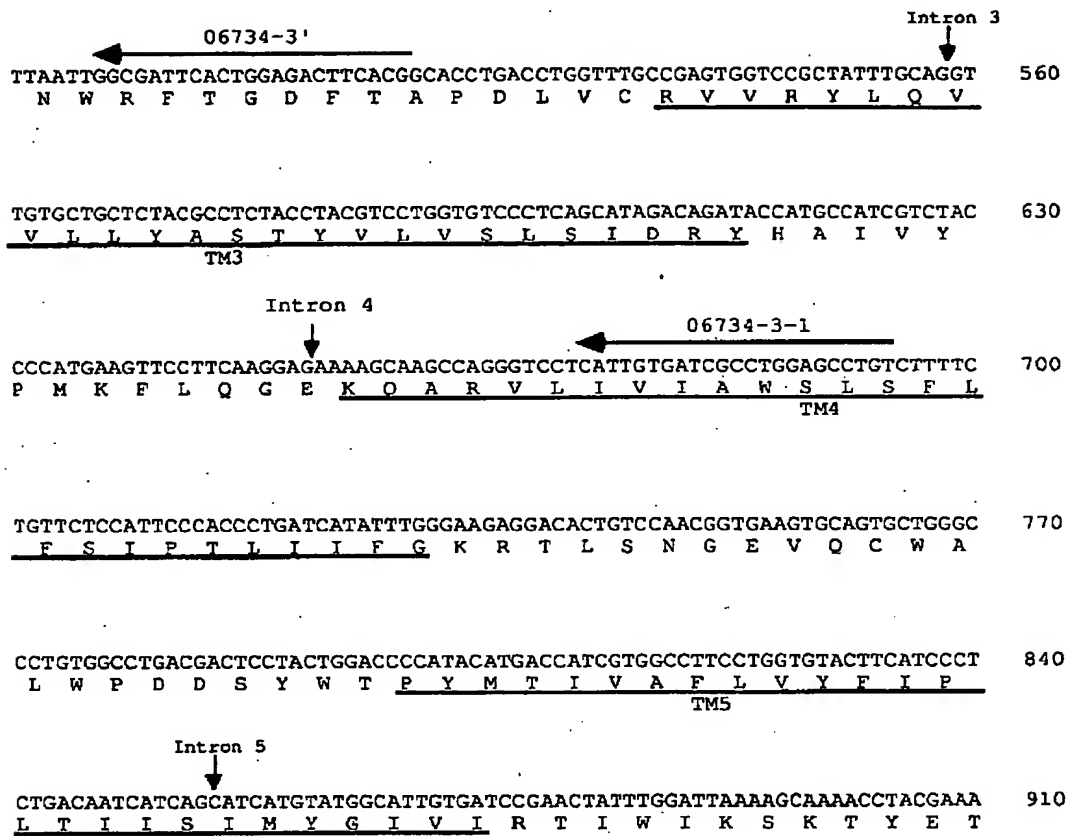
【図7】



【図10】



【図8】



【図12】

570 580 590 600 610 620 630
AAGCAAGCCAGGGTCCTCATTGTGATCGCCTGGAGCCTGTCTTTCTGTTCTCCATTCCCACCCTGATCA
S K P G S S L *
K Q A R V L I V I A W S L S F L F S I P T L I I

640 650 660 670 680 690 700
TATTGGGAAGAGGACACTGTCCAACGGTGAAGTGCAGTGTGGGCCCTGTGGCCTGACGACTCCTACTG
F G K R T L S N G E V Q C W A L W P D D S Y W

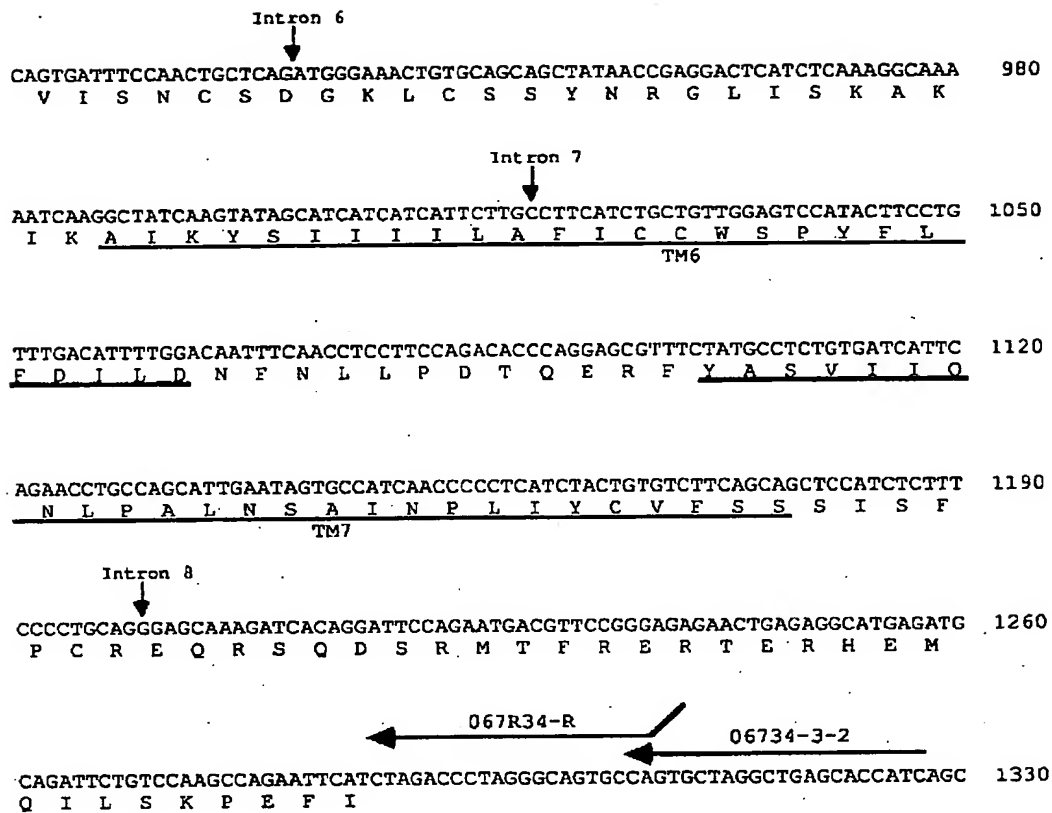
710 720 730 740 750 760 770
GACCCCATACATGACCATCGTGGCCTTCCTGGTGTACTTCATCCCTCTGACAATCATCAGCATCATGTAT
T P Y M T I V A F L V Y F I P L T I I S I M Y

780 790 800 810 820 830 840
GGCATTGTGATCCGAACATTTGGATTAAAAGGAAAACCTACGAAACAGTGATTTCCAACTGCTCAGATG
G I V I R T I W I K R K T Y E T V I S N C S D G

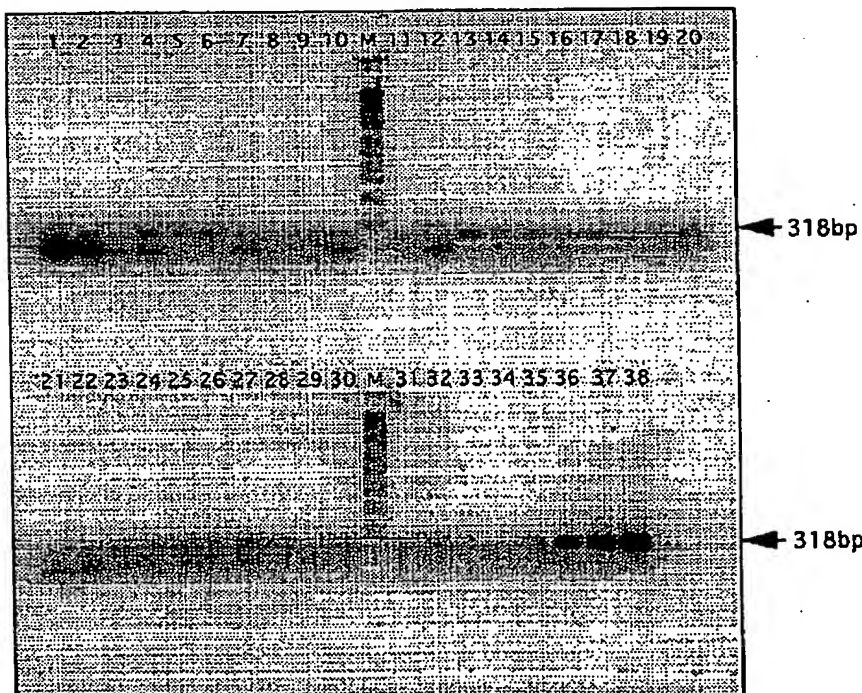
850 860 870 880 890 900 910
GGAAACTGTGCAGCAGCTATACCGAGGACTCATCTCAAAGGCAAAAATCAAGGCTATCAAGTATAGCATC
K L C S S Y T E D S S Q R Q K S R L S S I A S

920 930 940 950 960 970 980
ATCATCATTCTTGCCCTTCATCTGCTGTGGAGTCCATACTTCCTGTTGACATTTGGACAATTTCAACCTC
S S F L P S S A V E S I L P V D I L D N F N L

【図9】



【図15】

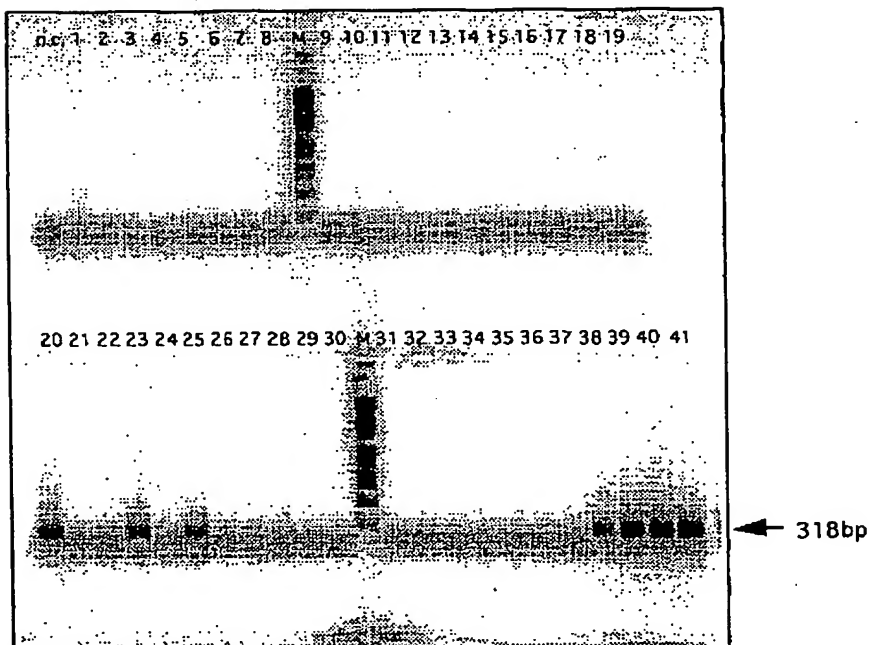


【図11】

10 20 30 40 50 60 70
 AGCACGTAGATCCTCCCTGTCATCAGGCAGAGCTCTTCAGTGAGGTGGGCTCAGGGAGGGCTCTGTGCCT
 80 90 100 110 120 130 140
 CCGTTCAGCAGAGCTGCAGCTGCTGCCAGCTCTCAGGAGGCAAGCTGGACTCCCTCACTCGGCTGCAGG
 150 160 170 180 190 200 210
 AGCAAGGACAGTGAGGCTCAACCCCGCCTGAGCCATGCCAGCCAACTTCACAGAGGGCAGCTTCGATTCC
 M P A N F T E G S F D S
 220 230 240 250 260 270 280
 AGTGGGACCGGGCAGACGCTGGATTCTTCCCCAGTGGCTTGCACTGAAACAGTGACTTTTACTGAAGTGG
 S G T G Q T L D S S P V A C T E T V T F T E V V
 290 300 310 320 330 340 350
 TGGAGGAAAGGAATGGGGTTCCTTCTACTACTCCTTTAAGACTGAGCAATTGATAACTCTGTGGGTCTCT
 E G K E W G S F Y Y S F K T E Q L I T L W V L
 360 370 380 390 400 410 420
 CTTTGTCTTTTACCATTGTTGGAACTCCGTTGTGCTTTTTTCCACATGGAGGAGAAAGAAGTCAAGA
 F V F T I V G N S V V L F S T W R R K K K S R
 430 440 450 460 470 480 490
 ATGACCTTCTTTGTGACTCAGCTGGCCATCACAGATTCTTTACAGGACTGGTCAACATCTTGACAGATA
 M T F F V T Q L A I T D S F T G L V N I L T D I
 500 510 520 530 540 550 560
 TTAATTGGCGATTCACTGGAGACTTCACGGCACCTGACCTGGTTTGCCGAGTGGTCCGCTATTTCAGAA
 N W R F T G D F T A P D L V C R V V R Y L Q K
 P G L P S G P L F A E

Intron 3
↓

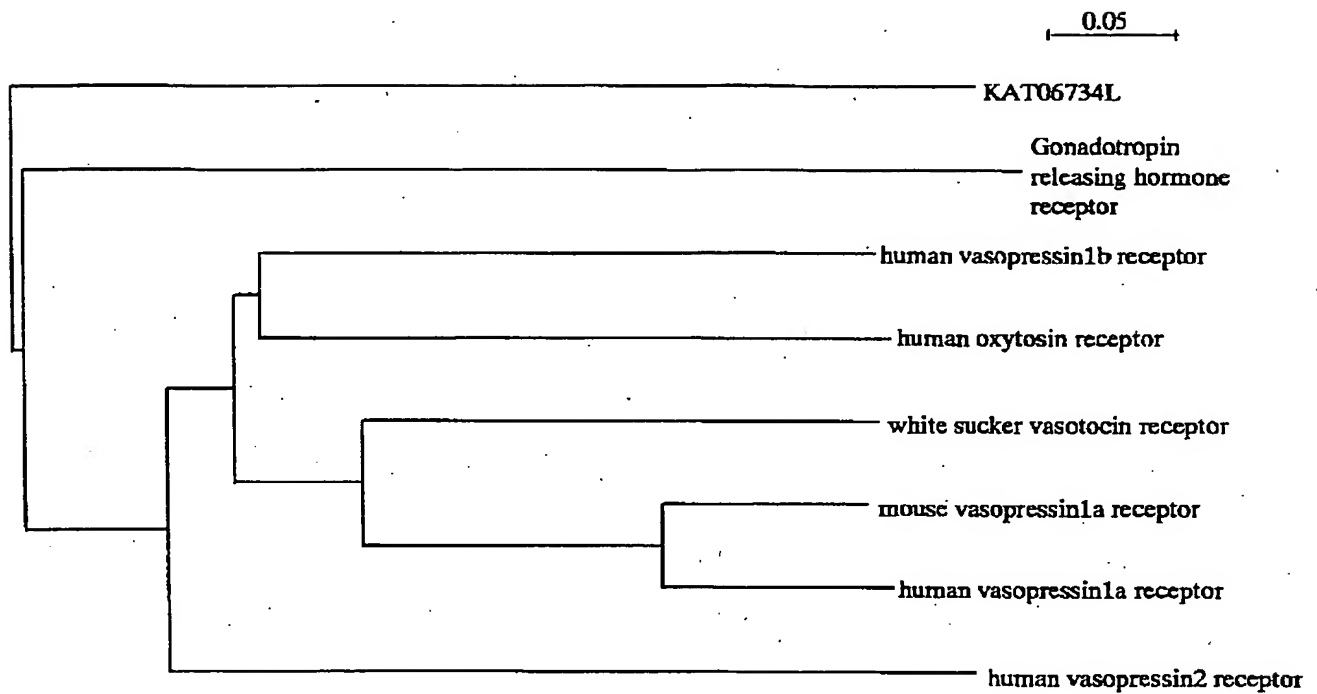
【図16】



【図13】

990 1000 1010 1020 1030 1040 1050
TTCCAGACACCCAGGAAGCGTTTCTATGCCTCTGTGATCATTGAGAACCTGCCAGCATTGAATAGTGCCA
F Q T P R K R F Y A S V I I Q N L P A L N S A I
1060 1070 1080 1090 1100 1110 1120
TCAACCCCTCATCTACTGTGTCTTCAGCAGCTCCATCTCTTCCCTGCAGGGAGCAAAGATCACAGGA
N P L I Y C V F S S S I S F P C R E Q R S Q D
1130 1140 1150 1160 1170 1180 1190
TTCCAGAATGACGTTCCGGGAGAGAACTGAGAGGCATGAGATGCAGATTCTGTCCAAGCCAGAATTATC
S R M T F R E R T E R H E M Q I L S K P E F I
1200 1210 1220 1230 1240 1250 1260
TAGACCCCTAGGGCAGTGCCAGTGCTAGGCTGAGCGCCATCAGCTCTCCAGGTCCTGTGCACCTGCTTGC
1270 1280 1290 1300 1310 1320 1330
GCACGTGCATGGAACCCGAGCCAACTTCACCCACCCTCGTCATTACCTGGGAGATGCACAAGACAAATG
1340 1350 1360 1370 1380 1390 1400
TTCTAATGACTGCATGCACTGCTTAAGTATTGGCCAAACACGAACTCCCCAGTTATTCATGCCAGCCAGGA
1410 1420 1430 1440 1450 1460 1470
AGGAAACGCCTTCCTTCCCCACCATTCAGCCCTCCTTCCCACTGGCCAGCACCTGAACCCAGTGAACA
1480 1490 1500 1510 1520 1530 1540
CAGGCATTAGTGGTCCAGGGTTCTGGCTTGGAGCCAGTGAGTAGACAGGCAAGCAGAGGGGACAAAGGTA
1550 1560 1570 1580 1590 1600 1610
GCTGGGTTATACATGAATATTCTCATTACAATAGGAGAAAATAAAAGACTTAATTAAGCCCCAAAAA
1620
AAAAAA

【図14】



フロントページの続き

(51)Int.Cl. ⁷	識別記号	F I	テマコード(参考)
A 6 1 K 45/00	1 0 1	A 6 1 P 25/00	4 B 0 6 5
A 6 1 P 25/00		35/00	4 C 0 8 4
35/00		C 0 7 K 14/705	4 C 0 8 5
C 0 7 K 14/705		16/28	4 H 0 4 5
16/28		C 1 2 N 1/15	
C 1 2 N 1/15		1/19	
1/19		1/21	
1/21		C 1 2 P 21/02	C
5/10		C 1 2 Q 1/68	A
C 1 2 P 21/02			Z
C 1 2 Q 1/68		G 0 1 N 33/15	Z
		33/50	Z
G 0 1 N 33/15		33/53	D
33/50			M
33/53		33/566	
		C 1 2 P 21/08	
33/566		(C 1 2 P 21/02	C

// C 1 2 P 21/08
 (C 1 2 P 21/02
 C 1 2 R 1:91)

C 1 2 R 1:91)
 C 1 2 N 15/00
 5/00

Z N A A
 A

(72)発明者 河合 宏紀
 東京都町田市旭町3丁目6番6号 協和醗
 酵工業株式会社東京研究所内
 (72)発明者 西 達也
 東京都町田市旭町3丁目6番6号 協和醗
 酵工業株式会社東京研究所内
 (72)発明者 中村 祐輔
 神奈川県横浜市青葉区あざみ野1-17-33
 (72)発明者 菅野 純夫
 東京都杉並区南荻窪4-8-13

Fターム(参考) 2B030 AB04 AD08 CA06 CA17 CA19
 CB03
 2G045 AA26 AA34 AA35 AA40 BB20
 CB01 CB17 CB20 CB21 DA12
 DA13 DA14 DA36
 4B024 AA11 AA12 BA53 BA63 CA04
 CA12 DA01 DA02 DA05 DA11
 EA04 GA03 GA14 HA01 HA12
 HA15
 4B063 QA01 QA05 QA12 QA19 QQ08
 QQ21 QQ33 QQ61 QQ62 QQ73
 QQ79 QQ89 QQ91 QQ94 QR32
 QR42 QR50 QR62 QR75 QR76
 QR77 QR78 QR80 QS03 QS05
 QS24 QS25 QS34 QX07
 4B064 AG01 AG26 AG27 BA14 CA02
 CA05 CA10 CA11 CA19 CA20
 CC24 DA01 DA13 DA14
 4B065 AA15X AA22X AA24X AA26X
 AA32X AA41X AA48X AA72X
 AA79X AA87X AA88X AA90X
 AA92X AA93X AA93Y AB01
 AB05 AC14 BA02 BA03 CA24
 CA25 CA44 CA46
 4C084 AA17 ZA022 ZB262
 4C085 AA13 AA14 BB50 CC03
 4H045 AA10 AA11 AA20 AA30 BA10
 CA40 DA50 EA20 EA50 EA51
 FA72 FA73 FA74 HA05